



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Héctor Marlon CHILQUILLO TORRES

Ronald Griego CERVANTES MACIZO

ASESORES

Francisco Javier María RAMÍREZ CRUZ

Elena Rafaela BENAVIDES RIVERA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Chilquillo H, Cervantes R. Efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira"

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**RONALD GRIEGO CERVANTES MACIZO Y
HÉCTOR MARLON CHILQUILLO TORRES**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Sobresaliente (18)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 06 de julio de 2017.

Dr. Américo Jorge Castro Luna
Presidente

Dra. Yadira Fernández Jeri
Miembro

Q.F. Eva Ramos Llica
Miembro

Q.F. María Rosario Carreño Quispe
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

AGRADECIMIENTOS

A nuestro asesor Mg. Francisco Javier María Ramírez Cruz y a nuestra co-asesora Dra. Elena Rafaela Benavides Rivera, por la orientación, paciencia, motivación, confianza en la realización de la tesis y durante el tiempo dentro de las aulas cuando fuimos alumnos.

A nuestro presidente de tesis el Dr. Américo y miembros del jurado, Eva Ramos, Rosario Carreño y Yadira Fernández, por su tiempo y enseñanza durante la revisión de la tesis, y así como dentro de las aulas.

A nuestros seres queridos, padres y hermanos, por la paciencia e incondicional apoyo moral para hacer posible la realización de este trabajo.

A cada uno de nuestros amigos por el apoyo brindado en las distintas etapas de este trabajo.

“La alegría está en la lucha, en el esfuerzo, en el sufrimiento que supone la lucha, y no en la victoria misma. Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”. Gandhi.

DEDICATORIA

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis queridos padres, Isabel y Augusto por los valores que me han inculcado, por su constante e invaluable apoyo durante mi desarrollo profesional y sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanos Karín y Eder por ser parte importante de mi vida, por su fraternidad, por los momentos compartidos y por ser mi inspiración para salir adelante.

A Estefany por brindarme todo su amor y comprensión, por aguantarme en mis malos ratos y siempre motivarme a seguir adelante.

Héctor M. Chílquillo Torres.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño:

A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa. Por guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y encarar las adversidades sin perder la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia porque por ellos soy lo que soy. A mis padres Tito y Flora, quienes me dieron la vida y han luchado por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, y sobre todo porque siempre me han brindado su amor. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir objetivos, por todo esto les agradezco de todo corazón.

“Gracias por todo papá y mamá”

A mi hermana Dora por estar siempre conmigo, apoyarme y sobre todo soportar mis malos ratos. Gracias por ser mi inspiración y modelo de profesional a seguir.

“Gracias por todo hermanita”

“Se fuerte y valiente, no tengas miedo ni te desanimes en nada de lo hagas, porque Dios está contigo donde quiera que vayas”.

Josué

Ronald G. Cervantes Macízo.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | iv |
| LISTA DE TABLAS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xi |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Objetivos | 3 |
| 1.1.1. Objetivo general | 3 |
| 1.1.2. Objetivos específicos | 3 |
| 1.2. Hipótesis | 3 |
| II. GENERALIDADES | 4 |
| 2.1. Antecedentes | 4 |
| 2.2. Marco teórico | 7 |
| 2.2.1. <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”. | 7 |
| 2.2.1.1. Clasificación taxonómica | 7 |
| 2.2.1.2. Descripción de la especie | 8 |
| 2.2.1.3. Ubicación geográfica y hábitat | 9 |
| 2.2.1.4. Usos tradicionales | 9 |
| 2.2.2. Fases, mecanismos y tipos de inflamación. | 9 |
| 2.2.3. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante | 19 |
| 2.2.4. Acción analgésica | 27 |
| 2.2.4.1. Mecanismos de analgesia | 29 |
| III. PARTE EXPERIMENTAL | 31 |
| 3.1. Materiales, equipos y reactivos | 31 |
| 3.2. Métodos y técnicas | 33 |
| 3.2.1. Recolección y desecación del material botánico | 33 |
| 3.2.2. Obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”. | 33 |
| 3.2.3. Preparación de los animales de laboratorio | 34 |
| 3.2.4. Ensayos fisicoquímicos | 35 |
| 3.2.4.1. Determinación de la solubilidad | 35 |

| | |
|---|----|
| 3.2.4.2. Marcha fitoquímica | 35 |
| 3.2.4.3. Cromatografía | 38 |
| 3.2.5. Ensayos biológicos | 39 |
| 3.2.5.1. Toxicidad oral aguda | 39 |
| 3.2.5.2. Efecto antiinflamatorio | 40 |
| 3.2.5.3. Efecto analgésico | 41 |
| 3.2.5.4. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> | 42 |
| 3.2.5.5. Actividad antioxidante <i>in vivo</i> | 44 |
| 3.2.5.5.1. Determinación de la Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) | 45 |
| 3.2.5.5.2. Determinación de la Actividad de la enzima Glutación Peroxidasa (GPx) | 48 |
| 3.2.5.5.3. Determinación de la actividad de la enzima Catalasa (CAT) | 49 |
| 3.2.5.5.4. Determinación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico | 51 |
| 3.3 Análisis estadístico | 53 |
| IV. RESULTADOS | 55 |
| 4.1. Pruebas fitoquímicas preliminares | 55 |
| 4.2. Toxicidad aguda | 57 |
| 4.3. Efecto antiinflamatorio | 58 |
| 4.4. Efecto analgésico | 61 |
| 4.5. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 62 |
| V. DISCUSIÓN | 68 |
| VI. CONCLUSIONES | 78 |
| VII. RECOMENDACIONES | 79 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |
| IX. ANEXOS | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs = Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos.

AIE = Antiinflamatorio esteroideo.

ATC= Ácido tricloroacético.

ATP = Adenosin trifosfato.

ANOVA = Análisis de varianza

AAP/AINE: Analgésico antipirético/Antiinflamatorio no esteroideo

BHT= Butilhidroxitolueno.

CAT = Enzima catalasa.

CIA= Comité de Ética para el Uso de Animales

COX = Ciclooxygenasa.

DAMPs= Patrones moleculares asociados a daño.

DNA = Acido desoxirribonucleico.

DPPH = 1,1-Difenil-2-picril hidrazilo.

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético

EROs = Especies reactivas del oxígeno.

ERN = Especies reactivas del nitrógeno.

EMP= Efecto máximo posible

GPx= Enzima Glutación Peroxidasa.

INT= Cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio.

iNOS = Enzima óxido nítrico sintetasa inducible.

IL = Interleukina.

IKK: Enzima Kinasa IKB.

Ig = Inmunoglobulina.

LkB = Proteína represora del FNkB.

MAPK = Proteína quinasa activada por mitógeno.

MDA = Malondialdehído

MHC = Complejo mayor de histocompatibilidad.

MYD88: Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88.

NAD⁺ = Nicotin adenin dinucleotido oxidado.

NFκB = Factor de transcripción nuclear kappa B.

NRL = Receptor tipo NOD.

OECD = Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo.

OLWA= Office of Laboratory Animal Welfare

PAMPs = Patrones moleculares asociados a patógenos.

PG = Prostaglandina.

PRR = Receptor de reconocimiento de patrón.

REDOX= Reacciones de oxidación-reducción.

RL= Radical libre.

SOD = Enzima Superóxido dismutasa.

TBA= Ácido tiobarbitúrico.

TBARS= Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.

TCR = Receptor de linfocitos T.

TLR = Receptor de tipo Toll.

TGF-β = Factor β de crecimiento tumoral.

Th0 = linfocito T helper o células T vírgenes.

TNF-α = Factor α de necrosis tumoral.

UICN = Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

UI = Unidades internacionales

XOD= Enzima Xantina oxidasa.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda.

Tabla 2. Componentes del sistema antioxidante.

Tabla 3. Grupos en estudio para la evaluación del efecto antiinflamatorio.

Tabla 4. Grupos en estudio para la evaluación del efecto analgésico.

Tabla 5. Esquema de trabajo para el ensayo de antioxidantes (DPPH).

Tabla 6. Grupos en estudio para la evaluación de la actividad antioxidante *in vivo*.

Tabla 7. Composición de los reactivos RANSOD para determinar la actividad de SOD.

Tabla 8: Preparación de patrones para curva de calibración SOD.

Tabla 9. Protocolo de análisis para determinar la actividad de SOD.

Tabla 10: Composición de los reactivos RANSEL para determinar la actividad de GPx.

Tabla 11. Protocolo de análisis para determinar la actividad de GPx.

Tabla 12. Protocolo de análisis para determinar la actividad de CAT.

Tabla 13. Protocolo de análisis para determinar las TBARS.

Tabla 14. Solubilidad del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”. 25 °C.

Tabla 15. Análisis cualitativo fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Tabla 16. Análisis de las bandas cromatográficas eluidas con metanol y características espectrofotométricas UV/Visible.

Tabla 17. Resultados del ensayo de toxicidad a dosis única.

Tabla 18. Resultados del ensayo sobre efecto antiinflamatorio.

Tabla 19. Porcentaje de inhibición de la inflamación con el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Tabla 20. Comparación de la actividad analgésica mediante ensayo Tail Flick del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” a diferentes concentraciones y el fármaco de referencia (Tramadol).

Tabla 21. Capacidad Antioxidante e IC 50 del Extracto Hidroalcohólico *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” diferentes concentraciones y fármacos de control.

Tabla 22. Niveles sanguíneos de Superóxido Dismutasa (U SOD/mL sangre) por administración del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Tabla 23. Niveles sanguíneos de Glutación Peroxidasa (U GPx/mL sangre) por administración del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Tabla 24. Niveles sanguíneos de Catalasa (UI CAT/mL sangre) por administración del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Tabla 25. Niveles sanguíneos de malondialdehído (umoles/mL sangre) por administración del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Figura 2. Vía inflamatoria genérica con agentes inductores, sensores, mediadores y efectores.

Figura 3. Cascada inflamatoria.

Figura 4. Respuesta inflamatoria crónica.

Figura 5. Mecanismo general de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno.

Figura 6. Esquema de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo.

Figura 7. Estructura de la ciclooxigenasa. Mecanismo de acción de los AINEs.

Figura 8. Especie botánica estudiada.

Figura 9. Estructura del DPPH en su forma radical y no radical.

Figura 10. Curva de calibración para la determinación de la actividad de SOD.

Figura 11. Formación y coloración del aducto MDA-TBA.

Figura 12. Métodos de experimentación utilizados con el extracto hidroalcohólico en los ensayos fisicoquímicos y biológicos del *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Figura 13. Curva tiempo-efecto promedio del volumen de inflamación para cada tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) “vira-vira”.

Figura 14. Porcentaje de la eficiencia antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) “vira-vira”.

Figura 15. Relación efecto máximo posible – tratamientos del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) “vira-vira” diferentes

concentraciones y el fármaco de referencia (Tramadol) mediante el ensayo latigazo de la cola (Tail Flick).

Figura 16. Actividad antioxidante *in vitro* (DPPH) del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) “vira-vira”.

Figura 17. Promedio de niveles sanguíneos de Superóxido Dismutasa (U SOD/mL sangre) por grupo de estudio.

Figura 18. Promedio de niveles sanguíneos de Glutación Peroxidasa (U GPx/mL sangre) por grupo de estudio.

Figura 19. Promedio de niveles sanguíneos de Catalasa (UI CAT/mL sangre) por grupo de estudio.

Figura 20. Promedio de niveles sanguíneos de malondialdehído (μ moles/mL sangre) por grupo de estudio.

RESUMEN

Senecio canescens (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira", es una especie herbácea de amplia distribución en el Perú y que se caracteriza por su conocido uso medicinal antiinflamatorio y analgésico, lo cual nos motivó a investigar y corroborar sus efectos farmacológicos. El efecto antiinflamatorio fue determinado por el método del edema plantar inducido por λ -carragenina en ratas. Se obtuvo una mayor eficacia antiinflamatoria a las concentraciones de 500 mg/kg (37,52 %) en comparación con los estándares de ibuprofeno 120 mg/kg (41,16 %) y de prednisona 1,2 mg/kg por vía oral (48,04 %). Para evaluar el efecto analgésico se realizó el ensayo de retirada de cola (Tail Flick) en ratones, las concentraciones que presentaron mayor actividad analgésica oral fueron a 1200 mg/kg (28,55 %) y 800 mg/kg (20,84 %), estas fueron comparadas al efecto del Tramadol 10 mg/kg por V.O. (39,67 %). Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro*, mediante la neutralización del radical del DPPH, obteniéndose un IC₅₀ de 62,95 μ g/mL para el extracto. Asimismo en la actividad antioxidante *in vivo*, la actividad de las enzimas SOD y GPx disminuyeron significativamente para concentraciones de 100 y 200 mg/kg en comparación con el grupo control; en el caso de la enzima CAT también disminuyó aunque no significativamente. La concentración de TBARS en los grupos que recibieron el extracto disminuyó significativamente en relación al grupo control. En conclusión, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* demostró efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante en los modelos experimentales trabajados, ubicándola como una especie promisoría y de alto interés.

Palabras clave: *Senecio canescens*, antiinflamatorio, analgésico, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Senecio canescens (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira", is an herbaceous species widely distributed in Peru and is characterized by its known medicinal use as anti-inflammatory and analgesic, which motivated us to investigate and corroborate its pharmacological effects. The anti-inflammatory effect was determined by the plantar edema method induced by λ -carrageenan in rats. A higher anti-inflammatory efficacy was obtained at concentrations of 500 mg/kg (37,52 %) compared to the standards of ibuprofen 120 mg/kg (41,16 %) and prednisone 1,2 mg/kg orally (48,04 %). To evaluate the analgesic effect, the tail flick test was performed in mice, the concentrations with the highest oral analgesic activity were 1200 mg/kg (28,55 %) and 800 mg/kg (20,84 %), these were compared to the effect of 10 mg / kg Tramadol per VO (39,67 %). The antioxidant activity was evaluated *in vitro*, by neutralizing the DPPH radical, obtaining an IC₅₀ of 62,95 μ g/mL for the extract. Also in the antioxidant activity *in vivo*, the activity of the SOD and GPx enzymes decreased significantly at concentrations of 100 and 200 mg/kg as compared to the control group; in the case of the CAT enzyme also decreased but not significantly. The concentration of TBARS in the groups receiving the extract decreased significantly in relation to the control group. In conclusion, the hydroalcoholic extract of the leaves of *Senecio canescens* showed anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effect in the experimental models worked, locating it as a promising species of high interest.

Key words: *Senecio canescens*, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant enzymes

I. INTRODUCCIÓN

El Perú, considerado el tercer país mega diverso del planeta, cuenta con un promedio de 25 000 especies de plantas medicinales, de las cuales una buena parte crece en los valles interandinos y es utilizada por sus diversas propiedades, siendo una fuente valiosa de prevención y curación para los pobladores rurales¹. Estas son una fuente importante de productos naturales biológicamente activos y se consideran una vía prometedora para el descubrimiento de nuevos fármacos debido al fácil acceso y costo relativamente bajo, ya que crecen de forma natural en abundancia relativa^{2,3}. Además, el uso de fitofármacos es una alternativa válida para implementar una política de atención primaria de salud por su bajo costo y su uso tradicional por lo que se debe garantizar que el fitofármaco tenga la calidad requerida y una eficacia probada⁴.

Senecio canescens (Humb. & Bonpl.) Cuatrec., conocido popularmente como “vira-vira”, es una especie herbácea, de amplia distribución en el Perú a la cual se le atribuye tradicionalmente efectos curativos como antiinflamatorios y analgésicos. Siendo los metabolitos secundarios de las plantas medicinales los responsables de sus diversos efectos terapéuticos que se les atribuyen, se hace necesario extraerlos, purificarlos y elucidar su estructura química empleando métodos modernos de la fitoquímica^{5,6}.

El proceso inflamatorio juega un rol importante como la respuesta básica del organismo ante heridas, estrés y las infecciones. Es la secuencia de eventos controlados, complicados e interrelacionados para proteger una lesión contra bacterias/virus, remover las células y el tejido muerto, y reparar el tejido dañado.

La respuesta inflamatoria saludable es benéfica temporalmente, pero desafortunadamente esta compleja regulación de la inflamación tiene un equilibrio precario que puede alterarse causando daño involuntario al tejido y generar una inflamación anormal o crónica. Este desequilibrio genera un estado “pro inflamatorio” descontrolado y capaz de provocar enfermedades⁷. Las diversas enfermedades son consecuencia del estrés oxidativo, que a su vez no es más que el resultado del daño originado por las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), lo cual tiene como base de generación a la inflamación⁸.

De lo mencionado anteriormente, resalta la importancia de nuestro trabajo en la investigación de plantas medicinales utilizadas tradicionalmente en el Perú, las cuales tienen potencial efecto: antiinflamatorio, analgésico y antioxidante. A su vez esta investigación será un soporte científico al uso tradicional de este recurso natural, como terapia alternativa para la Atención Primaria de Salud de la población con bajos recursos económicos, razón por la que el estudio tuvo como objetivo determinar el efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

- Determinar el efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

1.1.2. Objetivos específicos

- Obtener el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” e identificar los metabolitos secundarios principales, presentes en las hojas.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio *in vivo* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.
- Evaluar el efecto analgésico *in vivo* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

1.2. Hipótesis

- El extracto hidroalcohólico de las hojas *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”, tiene efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante.

II. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes

Se estudió la actividad antioxidante del extracto acuoso de *Senecio candicans* DC, mediante el método *in vitro* (DPPH) y el método *in vivo* de ácido tiobarbitúrico, a concentraciones de 125-500 µg/mL los resultados mostraron que el extracto de la muestra presentó una actividad igual al estándar de quercetina. Asimismo el screening fitoquímico demostró gran cantidad de flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides y terpenoides⁹.

En otro estudio se realizó un análisis comparativo en la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos alcohólicos de 4 especies del género *Senecio*, extraídos mediante soxhlet y concentrados en un rotavapor, del cual mencionaron que los flavonoides, triterpenos y esteroides son los responsables de la actividad antioxidante, obteniendo en su estudio una actividad antioxidante con un IC50 entre 25,40 y 70,80 µg/ usando el método del DPPH¹⁰.

En otro trabajo de investigación realizaron la actividad antiinflamatoria de *Senecio confusus* Britten en ratas, empleando el modelo experimental de inflamación producida por carragenina, demostrando actividad antiinflamatoria en *S. confusus*, sin embargo esta resultó menor al fármaco estándar indometacina. A pesar de esto, el extracto de *S. confusus* mostró ser menos agresivo con la mucosa gástrica comparado con indometacina, lo cual sugiere que el tratamiento con *Senecio confusus* muestra menor capacidad antiinflamatoria, pero a su vez ocasiona menor daño en el organismo¹¹.

En un estudio sobre estrés por inmovilización en ratas demostraron una manera de restringir los cambios oxidativos, mediante el potencial antiestrés de los componentes del Ocimumoside A y B; comprobaron que la SOD aumentó significativamente su actividad para inhibir la autoxidación de la adrenalina, además la capacidad de CAT para degradar el H_2O_2 aumentó pero sin significación estadística¹².

Se realizó una revisión química y farmacológica de diferentes plantas del género *Senecio*. En las hojas de *S. argunesis* encontraron seis flavonoides, en *S. pseudofitas* tres chalconas y por último en *S. mikanioides* encontraron dos xantonas además del 4-hidroxibenzoilado xantonio¹³.

En un determinado estudio demostraron cuales eran los tejidos más afectados mediante estrés por inmovilización, así como los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes, los niveles de oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica. Obtuvieron como resultados que el estrés por inmovilización genera mayor aumento de la actividad de la SOD y CAT en el cerebro, en comparación a los demás órganos (hígado, corazón, estómago) y de igual manera los niveles más altos de las TBARS se dieron en el cerebro¹⁴.

Se evaluaron la actividad cicatrizante del extracto etanólico de *Senecio culcitoides* Sch. Bip., reportando una amplia gama de metabolitos secundarios como: compuestos fenólicos, flavonoides y taninos; además de alcaloides, esteroides y/o triterpenoides. Utilizando la metodología UV-VIS, consiguieron identificar compuestos fenólicos tipo flavonoides (5,7-dihidroxi-4', 6,8-trimetoxiflavanona; 3',5-dihidroxi-4'-metoxi-7-O-rhannoglucosyl flavanona) y una chalcona (3,4-dihidroxichalcona). Posteriormente elaboraron una crema al

20 % del extracto etanólico, la cual mostró una actividad cicatrizante significativa en comparación con una crema estándar “vibe” o sangre de grado al 1 %¹⁵.

En otro estudio reportaron un aumento en la actividad antioxidante de las enzimas SOD y CAT en eritrocitos, además de un incremento significativo de las TBARS en el plasma sanguíneo. Este estudio lo realizaron en ratas mediante estrés por inmovilización obteniendo sangre de la vena de la cola 48 horas antes del estrés, inmediatamente después del estrés, y 48 horas después del cese del estrés, para su posterior lectura¹⁶.

En otro trabajo de investigación de la misma especie, encontraron que el extracto metanólico de “huira-huira” (*Culcitium canescens* Humb. & Bonpl., basónimo de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec.; Compositae) muestra un efecto analgésico a dosis de 2 a 3 g/kg, en la prueba de contorciones inducidas por ácido acético. Los resultados también demuestran, el efecto analgésico no dependiente de la dosis. Por otro lado, la prueba de presión de cola, demuestra que el umbral de dolor es reducido dependiendo de la dosis¹⁷.

2.2. Marco teórico

2.2.1. *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

2.2.1.1. Clasificación taxonómica

Esta llamativa especie botánica, pertenece al Orden Asterales. Se circunscribe dentro de la familia Asteraceae, la cual a su vez representa, la segunda mayor familia en número de especies dentro de las fanerógamas a nivel mundial. Pertenece a la tribu Senecioneae, subtribu Senecioninae y al género *Senecio* L¹⁸.

Senecio L., como tal, es uno de los géneros más diversos de plantas con flores, con más de 1250 especies, de distribución cosmopolita, a excepción de la Antártida, presentando la mayor concentración y riqueza en los Andes sudamericanos y al sur de África¹⁹. Las especies de *Senecio*, circunscritas en la tribu Senecioneae²⁰, son morfológicamente variables, especialmente en las hojas, así como en las formas de crecimiento, que van desde hierbas anuales y perennes hasta arbustos.

El ordenamiento taxonómico dentro del género es dinámico, muchas especies han sido transferidas a géneros ya descritos o se han establecido géneros nuevos como *Lomanthus*²¹. A nivel específico se hace necesario un nuevo reagrupamiento, particularmente entre las entidades sudamericanas²².

Para el Perú han sido registradas 177 especies, las que ocupan diversos ambientes ecológicos, desde la costa desértica, lomas, matorrales xerofíticos, valles interandinos hasta la puna, en el límite de la vegetación. Muchas de estas especies presentan distribución restringida y están consideradas como endémicas²¹. Recientemente 94 especies endémicas de *Senecio* para el Perú han sido evaluadas y categorizadas según los criterios de la UICN²³.

2.2.1.2. Descripción de la especie Botánica.

Hierba erguida 25-55 cm de alto, densamente lanosa. Tallo florífero, cilíndrico. Hojas basales arrosetadas, peciolo 3-9 cm de largo, alado, lanoso, vaina laminar con la cara externa lanosa blanquecina, la interna glabra y visiblemente estriada longitudinalmente; limbo oblongo espatulado, 15-45 x 1.5-4.5 cm, margen entero, revuelto, ápice obtuso, base atenuada densamente lanoso, en ambas caras, visiblemente uninervada en el haz, las hojas superiores son escasas. Capítulo discoídeo, terminal nutante, solitario o varios en racimo; involucro discoídeo 5-8 x 6-10 cm, brácteas involucrales numerosas, biseriadas, oblongas cano-lanosas en el dorso. Flores actinomorfas, hermafroditas isomorfas, corola amarilla tubulosa pentadentada, dientes agudos, ramas de estilo rectangulares, con el ápice truncado penicilado, anteras apendiculadas en el ápice, base obtusa, filamento lacriforme en la mitad superior. Pappus formado por numerosos pelos canos. Aquenio cilíndrico²⁴.



Figura 1. *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”²⁵.

2.2.1.3. Ubicación geográfica y hábitat

Senecio canescens presenta una amplia distribución, desde los Andes de Venezuela hasta Argentina. En el Perú crece en áreas expuestas de los pajonales, en Áncash, Apurímac, Huánuco, Junín, Cuzco, Huancavelica, La Libertad, Lima, Tacna, Pasco y Puno, entre los 3500 y 5000 m de altitud. En Lima, en las provincias de Canta, Huaral, Huarochirí, Oyón y Yauyos¹⁹.

2.2.1.4. Usos tradicionales

Usada como planta medicinal con el nombre de “vira-vira”, “wira-wira”, “oreja de conejo”, “ancosh” y “wila-wila”¹⁹. Dentro del ámbito nacional, el uso medicinal de *Senecio canescens*, para contrarrestar afecciones respiratorias es bien conocido y reportado²⁶⁻³¹. En todos los casos la parte de la planta que es usada son las hojas, y su forma de preparación es a partir de la decocción de las mismas.

Okuyama et al., 1994 demostró el efecto analgésico de *Senecio canescens*¹⁷. Por otra parte, Bussmann et al., 2008; 2010 probó la eficacia bactericida de *Senecio canescens*, contra *Staphylococcus aureus*, con resultados positivos^{19,31}.

2.2.2. Fases, mecanismos y tipos de inflamación.

El sistema inmunitario tiene la capacidad para discriminar entre lo propio y lo extraño, mediante diferentes tipos celulares y factores solubles encargados de la eliminación de agentes dañinos. Es así que se distingue dos mecanismos inmunitarios: A) Sistema inmune innato o no adaptativo (acción rápida e inespecífica) y el otro, B) Sistema inmune específico o adaptativo (posee

memoria inmunológica y genera respuestas rápidas y específicas ante reexposiciones). La inflamación es un nexo de unión y coordinación entre el sistema inmune innato y adaptativo. Además, facilita el estímulo antigénico que inicia los procesos de defensa, reparación y recuperación de la función de los tejidos afectados.

La inflamación es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica^{32,33}.

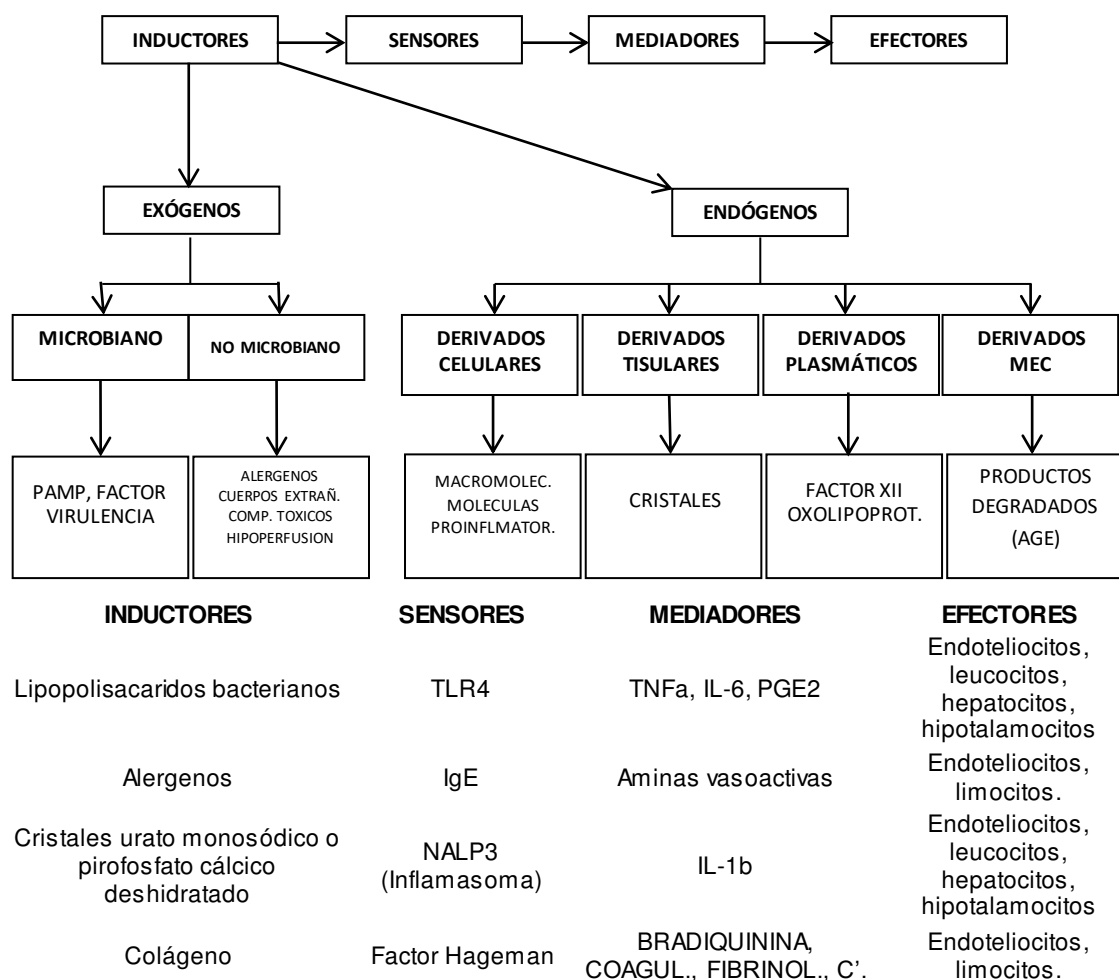


Figura 2. Vía inflamatoria genérica con agentes inductores, sensores, mediadores y efectores³⁹.

2.2.2.1. Fases de la inflamación

- a. **Liberación de mediadores.** Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
- b. **Efecto de los mediadores.** Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- c. **Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.** Proceden, en su mayor parte, de la sangre pero también de las zonas circundantes al foco.
- d. **Regulación del proceso inflamatorio.** Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- e. **Reparación.** Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria³⁴.

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La fase aguda se caracteriza por su breve duración, la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos. La fase crónica se caracteriza por una mayor duración, la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos, la fibrosis y la necrosis³⁵.

2.2.2.2. Mecanismos de la inflamación

La inflamación consiste en una cascada estrictamente regulada de procesos inmunológicos, fisiológicos y conductuales dirigidos por moléculas de señalización inmune solubles llamadas “citoquinas”³⁶. Estos estímulos inflamatorios se reconocen por primera vez por las células huésped a través de receptores transmembrana específicos, llamados receptores de reconocimiento de patrón (PRR), que son expresados por células tanto de sistemas inmunes innatos como adaptativos. Los PRR son receptores codificados en la línea germinal, los cuales son responsables de detectar la presencia de microorganismos infectantes, así como la incidencia de cualquier daño celular³⁷.

El primer paso de la cascada inflamatoria implica el reconocimiento de la infección o daño. Esto se logra típicamente mediante la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que están dirigidos específicamente a motivos generales de moléculas expresadas por patógenos que son esenciales para la supervivencia de patógenos. Así como también los “Alarmins”, o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), son moléculas endógenas que señalan daño o necrosis y también son reconocidas por el sistema inmune innato. Una ventaja de la detección de estas señales es que la orientación inadvertida de las células huésped y tejidos se minimiza³⁶.

Actualmente se conocen varios tipos de PRR con la capacidad selectiva de detectar PAMPs, DAMPs o ambos y estos incluyen receptores Toll-like (TLR-activador de NF- κ B: factor nuclear kappa-encadenamiento de la cadena ligera de células B activadas), receptores de Lectina de tipo C (CLR), receptores similares a RIG-1 (RLRs) y receptores tipo NOD (NLR)^{36,37}.

La transcripción y traducción de genes conduce a la tercera etapa de la cascada inflamatoria, que es la expresión inducible de citocinas proinflamatorias, tales como interleucina-1-beta (IL-1 β), IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). En combinación con quimiocinas (atrayentes) y diversas moléculas coestimuladoras, estas proteínas solubles facilitan el reclutamiento de células efectoras, tales como monocitos y neutrófilos, al sitio de perturbación³⁶.

Es así que se genera una adhesión de neutrófilos a la región afectada, favoreciendo el estrés oxidativo y la liberación de productos químicos tóxicos como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EROs y ERN, respectivamente) y enzimas lisosómicas^{38,39}. Las cuales actúan destruyendo tanto a los patógenos como a los huéspedes, induciendo esencialmente la licuefacción del tejido circundante y evitando las metástasis microbianas. Estos mecanismos efectores son, por lo tanto, los principales contribuyentes para albergar daños colaterales. Esta interacción es el origen de los efectos de la inflamación: calor, hinchazón, enrojecimiento y dolor³⁹.

La última fase de la inflamación es su resolución, regeneración de las células originales y restablecimiento a la normalidad de la zona en la que se produjo el daño. Este proceso es crítico para limitar el daño colateral al huésped⁴⁰. Después de las primeras horas de inflamación, un programa coordinado de resolución es puesto en movimiento por macrófagos residentes y reclutados de tejidos. Durante la inflamación aguda, estas células producen prostaglandinas proinflamatorias y leucotrienos, pero rápidamente cambian a las lipoxinas, que bloquean más el reclutamiento de neutrófilos y en su lugar

favorecen la infiltración mejorada de monocitos importantes para la cicatrización de heridas³⁶.

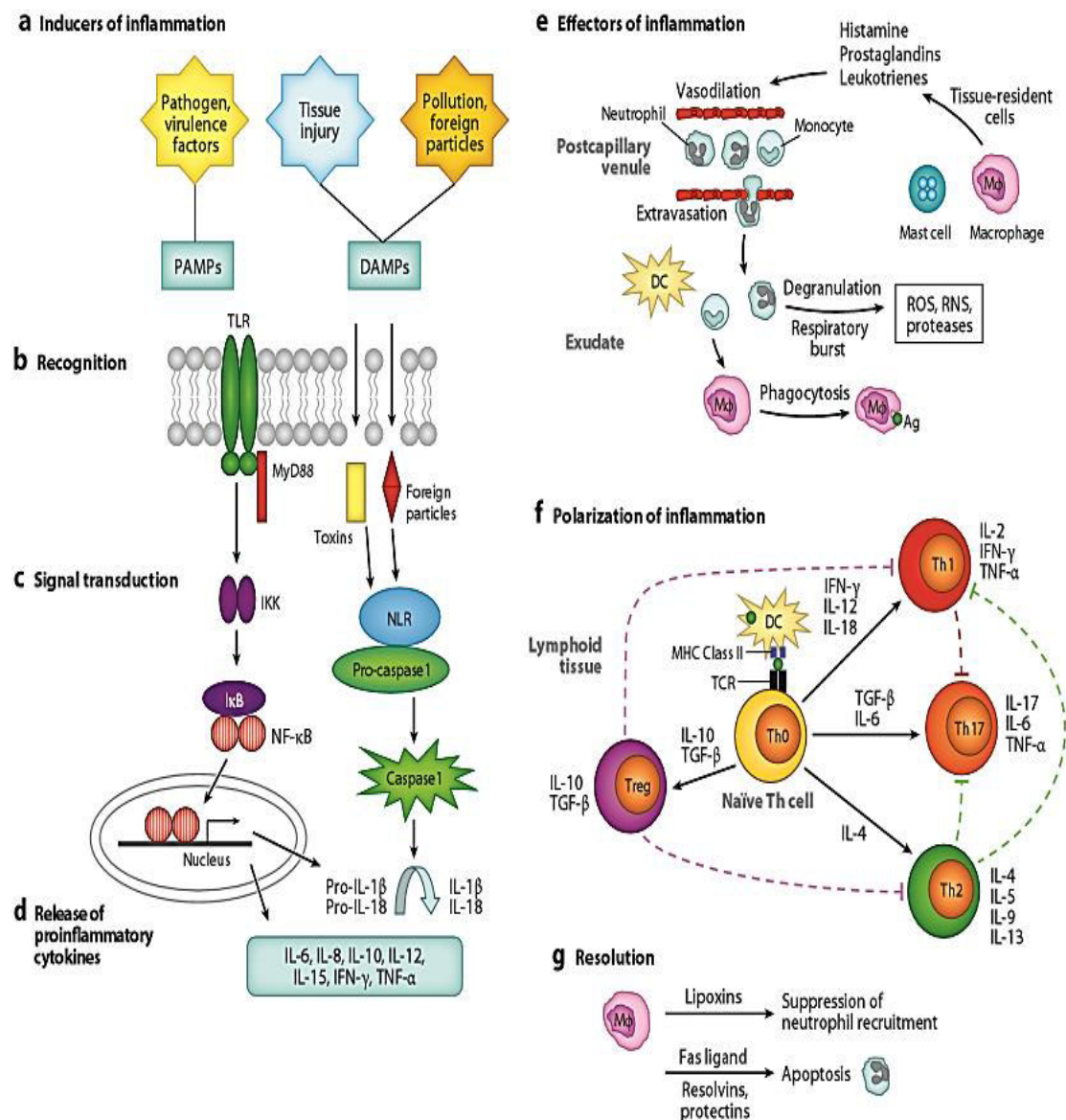


Figura 3. Cascada inflamatoria³⁶.

En la figura 3 (a) Patógenos, lesiones tisulares y partículas extrañas que inducen inflamación. (b) El TLR transmembrana y el NLR intracelular se unen a PAMPs o DAMPs, respectivamente. (c) Los TLRs activan una vía de transducción de señal dependiente de MyD88 que implica la fosforilación de la proteína LkB inhibitoria por IKK. NF-κ B es liberado de Lk B y translocado al

núcleo donde la transcripción es regulada a través de la unión a los genes inflamatorios de destino. Los NLRs señalan el inflammasoma, que activa la caspasa-1 para convertir citoquinas en formas activas (IL-1 β e IL-18), que luego provocan inflamación después de ser liberadas de la célula. (d) Una variedad de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas se producen y liberan para promover funciones efectoras de la inflamación. (e) Los neutrófilos y monocitos transmitidos por la sangre migran al sitio de alteración por quimiotaxis y pasan selectivamente a través de las células endoteliales para alcanzar el sitio objetivo (extravasación). Las células madre y los macrófagos residentes en los tejidos promueven esta migración al liberar histamina, leucotrienos y prostaglandinas, que tienen efectos rápidos sobre la vasculatura, incluyendo vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Los neutrófilos liberan compuestos tóxicos, incluyendo las EROs, ERN, y varias proteasas, que son inespecíficas y dañan tanto al patógeno como al huésped. Los macrófagos y las células dendríticas participan en la fagocitosis de Ag. (f) Estas células migran al tejido linfático y priman las células T nativas (Th0) para que se polaricen a través de la estimulación de la TCR por el antígeno unido a los receptores de la clase II de MHC. Las células Th0 se diferencian en varios tipos diferentes de células efectoras y reguladoras: células Th1 (proinflamatorias), células Th2 (antiinflamatorias), Tregs (reguladoras) y células Th17 proinflamatorias. (g) La resolución de la inflamación ocurre cuando los neutrófilos promueven el cambio de los leucotrienos producidos por los macrófagos y otras células a las lipoxinas, lo que inicia la terminación de la inflamación. El ligando Fas, las resolvinas y las proteínas promueven la

apoptosis de los neutrófilos. Los macrófagos fagocitan los neutrófilos apoptóticos y los desechos celulares³⁶.

2.2.2.3. Inflamación aguda

La inflamación aguda constituye una respuesta natural, de carácter protector, que pretende librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias que esta provoca. La alteración de la permeabilidad constituye la característica principal y de mayor especificidad, provoca el exudado profuso hacia el intersticio. La pérdida de proteínas del plasma reduce la presión osmótica intravascular y el incremento en el intersticio; secundario a la vasodilatación aumenta la presión hidrostática intravascular, lo que conduce a una importante salida y acumulación de líquido en el tejido intersticial, formándose finalmente el edema ofensor⁴⁰.

Esta es notable por la intensidad de los síntomas generales y locales. Según su rapidez se distingue la inflamación aguda como el grado más alto de la inflamación con caracteres anatómicos muy marcados y síntomas intensos. Mientras la inflamación subaguda presenta los síntomas poco intensos, su curso es menos rápido que en las inflamaciones ordinarias, además es la transición de la inflamación aguda a la crónica⁴¹.

Varios son los elementos implicados en la respuesta inflamatoria aguda (RIA), entre ellos: el plasma, células circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos), los vasos sanguíneos y los constituyentes celulares (mastocitos, fibroblastos y macrófagos) y extracelulares (colágeno, elastina, glicoproteínas de adhesión como la fibronectina, laminina, colágeno no fibrilar, tenascina, y proteoglicanos) del tejido conjuntivo además; la

respuesta celular y vascular de la RIA están mediadas por factores químicos provenientes del plasma o de las células que son activadas por el propio estímulo inflamatorio. Estos mediadores actúan de forma aislada, secuencial o en combinación, y en fases posteriores amplifican la respuesta inflamatoria e influyen en su evolución. Las células y tejidos necróticos también pueden activar la formación de mediadores químicos⁴⁰.

Tabla 1. Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda⁴⁰.

| Medidor Químico | Acción |
|---|--|
| Histamina y serotonina (aminas vasoactivas) | Incremento de la permeabilidad. |
| Bradicinina | Incremento de la permeabilidad y dolor. |
| C3a (producto del complemento, anafilotoxinas) | Incremento de la permeabilidad opsonina. |
| C5a (producto del complemento, anafilotoxinas) | Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria. |
| Prostaglandinas (metabolismo del ácido araquidónico) | Vasodilatación, dolor, fiebre, activa a otros mediadores. |
| Leucotrieno B4 (metabolismo del ácido araquidónico) | Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria. |
| Leucotrieno C4, D4, E4 (metabolismo del ácido araquidónico) | Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, vasoconstricción. |
| Metabolitos del oxígeno (radicales libres) | Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular. |
| Factor activador de plaquetas (PAF) | Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, cebado de leucocitos. |
| Interleucina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF)(citocinas) | Reacciones de fase aguda, activación endotelial, quimiotaxis. |
| Oxido nítrico | Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad. |

2.2.2.4. Inflamación crónica

La inflamación crónica puede comprender una duración prolongada en el tiempo (semanas, meses) comprendido por el constante estímulo inflamatorio. Este proceso se origina por una progresión de episodios agudos mal resueltos y repetidos. Además, su etiología es variable. Puede originarse por organismos infecciosos que han resistido o evadido la fagocitosis, sobreviviendo en regiones dañadas y mal drenadas como los abscesos. El origen del estímulo inductor de la inflamación crónica reside en la regulación de la respuesta inmunitaria y la producción de anticuerpos contra tejidos propios

(autoanticuerpos). Clínicamente la inflamación crónica se caracteriza por la ausencia de algunos signos como: calor, enrojecimiento son menores y la fiebre es menor y cíclica³².

Se caracteriza porque implica principalmente células mononucleares, fibroblastos y formación de nuevos vasos sanguíneos llamados “tejidos de granulación”. Este proceso además de ser exudativo (sólido, blanco o grisáceo), suele ser productivo o proliferativo. Es así que las células tienden a producir sustancias que añaden tejido nuevo, como el colágeno y los nuevos vasos sanguíneos, siendo así más hinchadas y firmes. De esta manera tiene cierta relación con el proceso de reparación⁴².

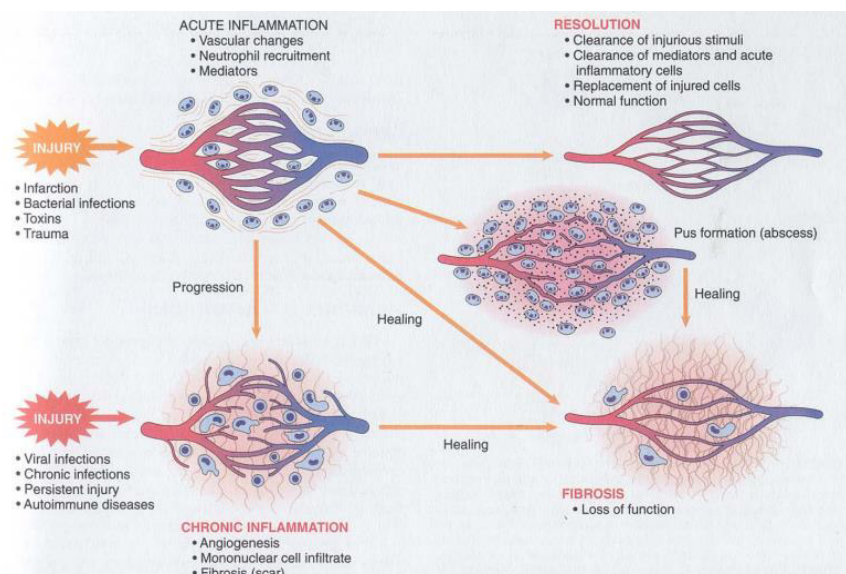


Figura 4. Respuesta inflamatoria crónica⁴².

Características histológicas. La inflamación crónica⁴³ se caracteriza por:

- ✓ Infiltración por células mononucleares, como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, que refleja reacción persistente a la lesión.
- ✓ Destrucción tisular, inducida principalmente por las células inflamatorias.

- ✓ Intentos de reparación mediante sustitución por tejido conjuntivo del tejido lesionado, con proliferación de vasos de pequeño calibre (angiogénesis) y en especial con fibrosis.

2.2.3. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante.

Se considera un radical libre (RL) a un átomo o molécula con uno o más electrones desapareados en su último orbital. Esta configuración lo hace muy inestable, de vida efímera y extraordinariamente reactivo, es decir son capaces de dañar moléculas biológicamente relevantes tales como ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos tanto en el núcleo como en las membranas celulares, dando así lugar al daño celular y alteración homeostática^{8,44-46}.

2.2.3.1. Producción de radicales libres

De todos los radicales, resultan de gran interés las especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs), debido a la estructura birradical de esta molécula y al gran número de procesos en los que puede verse involucrado⁴⁷.

Los radicales libres y otras EROs surgen de los procesos metabólicos esenciales normales en el cuerpo humano o de fuentes externas tales como la exposición a los rayos X, el ozono, el consumo de cigarrillos, contaminantes del aire, y productos químicos industriales. La formación de EROs puede ocurrir en las células de dos maneras: las reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas, que sirven como fuente de radicales libres, incluyen los implicados en la cadena respiratoria, en la fagocitosis, en la síntesis de prostaglandinas, y en el sistema del citocromo P-450. Los radicales libres pueden también ser formados en reacciones no enzimáticas del oxígeno con compuestos orgánicos, así como las iniciadas por reacciones ionizantes^{46,48}.

La producción de energía para los procesos celulares requiere de O_2 , el cual es reducido a agua (H_2O) tras aceptar cuatro electrones por el complejo citocromo-oxidasa de la mitocondria. Normalmente, 2 % del oxígeno es reducido de forma incompleta, al aceptar un menor número de electrones originando EROs ⁸.

Un radical primario es superóxido (O^{2-}), que está formado por la reducción de un electrón de oxígeno molecular. Esta es la reacción catalizada por NADPH oxidasa, con electrones suministrados por NADPH^{49,50}, éste se forma en cualquier sistema capaz de generar electrones libres y que cuente con la presencia de oxígeno; por otro lado, es producido por macrófagos, neutrófilos, leucocitos, fibroblastos y células del endotelio vascular. Se considera un radical poco reactivo, aunque es capaz de oxidar grupos tiol, ácido ascórbico y ha sido implicado en lesiones por reperusión tras un periodo de isquemia⁵¹.

El radical hidroperóxido (HO^{*2}), es mucho más reactivo frente a biomoléculas, capaz de iniciar la peroxidación lipídica. Su importancia radica en la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), especie reactiva generada por una reacción de dismutación catalizada por la enzima Superóxido Dismutasa (SOD)⁴⁵. En presencia de metales como fierro (Fe), cobre (Cu), cobalto (Co) y níquel (Ni), el H_2O_2 es transformado en el radical hidroxilo ($\bullet OH$), una especie mucho más reactiva a través de la reacción de Haber- Weiss o Fenton^{8,50}.

En general, el metabolismo aerobio implica la producción de especies reactivas; capaces de generar estrés oxidativo, reaccionar con biomoléculas y participar en procesos degenerativos y fisiopatológicos.

2.2.3.2. Sistema antioxidante celular

La vida aeróbica exige contar con una batería múltiple de defensa contra los diversos RL de oxígeno, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro, los neutralicen una vez formados⁴⁴. El cuerpo tiene varios mecanismos para contrarrestar el estrés oxidativo mediante la producción de antioxidantes, ya sea de forma natural generado *in situ* (antioxidantes endógenos), o externamente a través de alimentos suministrados (antioxidantes exógenos). El papel de los antioxidantes son neutralizar el exceso de radicales libres, para proteger las células contra sus efectos tóxicos y así contribuir a la prevención de enfermedades como el cáncer, trastornos autoinmunes, envejecimiento, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas⁴⁸. Los antioxidantes se pueden agrupar según su naturaleza química y su modo de acción:

Tabla 2. Componentes del sistema antioxidante⁵².

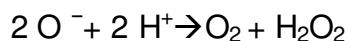
| Tabla 2. Componentes del sistema antioxidante. | |
|--|--|
| Componentes antioxidantes | Acción antioxidante |
| Enzimas | |
| Dismutasa del superóxido | Remover radical superóxido |
| Catalasa | Convertir H ₂ O ₂ a H ₂ O |
| Peroxidasa de glutatión | Convertir H ₂ O ₂ a H ₂ O |
| Tioredoxina | Convertir H ₂ O ₂ a H ₂ O |
| Secuestradores de iones de Metales | |
| Metalotioneina | Quelantes de cinc, cobre e hierro |
| Fitoquelantes | |
| Transferrina | |
| Albúmina | |
| Baja masa molecular | |
| Uratos (endógenos) | Recicladores de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno |
| Vitamina C (exógeno) | |
| Vitamina E (exógeno) | |
| Carotenoides (exógeno) | |
| Fitoquímicos (exógeno) | |

a. Enzimas

Actúan específicamente sobre las EROs, degradándolas a moléculas menos nocivas mediante mecanismos bioquímicos específicos. El proceso inicia con la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD); posteriormente, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) actúan convirtiendo el H_2O_2 en H_2O . La actividad de estas enzimas debe estar en equilibrio para mantener el equilibrio REDOX intracelular⁴⁸.

- Superóxido Dismutasa (Superóxido Oxidorreductasa, E.C. 1.15.1.1.)

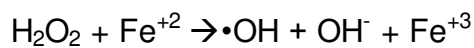
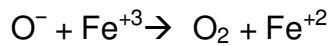
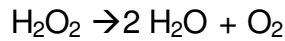
Las Superóxido Dismutasa (SODs) son una clase de enzimas estrechamente relacionadas que catalizan la descomposición del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Las enzimas SOD están presentes en casi todas las células aeróbicas y en los fluidos extracelulares. En los seres humanos (como en todos los demás mamíferos), están presentes 3 formas de superóxido dismutasa. SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias, y SOD3 es extracelular^{46,48,53}.



- Catalasa (Peróxido de Hidrógeno Oxidorreductasa, E.C. 1.11.1.6.)

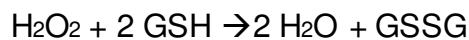
La catalasa es una enzima común que se encuentra en casi todos los organismos vivos, que están expuestos al oxígeno, en los cuales su función es catalizar la conversión del H_2O_2 en H_2O . En ausencia de esta enzima el H_2O_2 acumulado reacciona con metales como Fe^{+2} y Cu^{+2} que se encuentran en el medio para producir el radical $\cdot OH$, a este tipo de reacciones se les conoce como Fenton. El peróxido de hidrógeno es un subproducto nocivo de muchos

procesos metabólicos normales por lo cual para evitar daños, debe ser convertido rápidamente en otras sustancias menos peligrosas. Todos los animales conocidos utilizan catalasa en todos sus órganos, con concentraciones particularmente altas en el hígado y riñones^{46,54}.



- Glutación Peroxidasa (E.C. 1.11.1.9.)

La enzima glutación peroxidasa (GPx) es una selenoproteína, es decir, es una enzima selenio (Se) dependiente⁴⁷; cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos. Hay por lo menos cuatro isoenzimas glutación peroxidasa diferentes en animales⁵⁵. Glutación peroxidasa (GPx 1) es la más abundante y es un agente de barrido muy eficiente de peróxido de hidrógeno, mientras que la glutación peroxidasa 4 es la más activa con hidroperóxidos de lípidos. Estas enzimas se encuentran en niveles particularmente altos en el hígado y también sirven en el metabolismo de desintoxicación⁴⁶.



GLUTATION OXIDADO

b. Antioxidantes preventivos

Moléculas encargadas de secuestrar a los iniciadores del proceso oxidativo, tales como Fe y Cu, los cuales aceleran la formación de EROs. Ejemplo de estos son las proteínas circulantes transportadoras de hierro. Se encargan de enlazar al hierro deteniendo o retardando su participación en la

reacción de Haber–Weiss y en la peroxidación lipídica. Aunado a esto, la ceruloplasmina, proteína circulante portadora de cobre, oxida al ión Fe^{2+} a Fe^{3+} por lo que inhibe el proceso lipoperoxidativo y la reacción de Fenton. En el plasma el Cu^+ no unido a la ceruloplasmina está ligado a la albúmina, aunque ésta no previene su interacción con H_2O_2 para formar el radical hidroxilo^{8,47}.

c. Antioxidantes secuestradores de las EROs

Inhiben la cadena de reacción y propagación en la formación de radicales libres. El ácido úrico representa aproximadamente la mitad de la capacidad antioxidante del plasma ya que es capaz de atrapar radicales peroxilo, alcoxilo, EROs e iones de Cu^+ y Fe^+ . La bilirrubina es un producto secundario del metabolismo del grupo hemo (grupo prostético con Fe^+ , capaz de unir átomos de O_2), con actividad antioxidante que inhibe la peroxidación lipídica en los sistemas celulares^{8,46}.

d. Antioxidantes nutricionales

Para proteger a la célula en contra de los efectos de la oxidación, los sistemas de defensa antioxidante deben actuar en conjunto para formar un sistema íntegro en donde los antioxidantes de nuestra dieta juegan un papel importante para ayudar a los antioxidantes endógenos a neutralizar el estrés oxidativo. La deficiencia de nutrientes antioxidantes es una de las causas de numerosas patologías crónicas y degenerativas. Cada nutriente es único en términos de su estructura y función antioxidante.

En este sentido, varios metales (Cu, Zn, Se, Mn y Fe) participan como componentes o cofactores de enzimas antioxidantes; al igual que las vitaminas, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno y ácido fólico, las cuales actúan como atrapadores de las EROs^{8,46,56}.

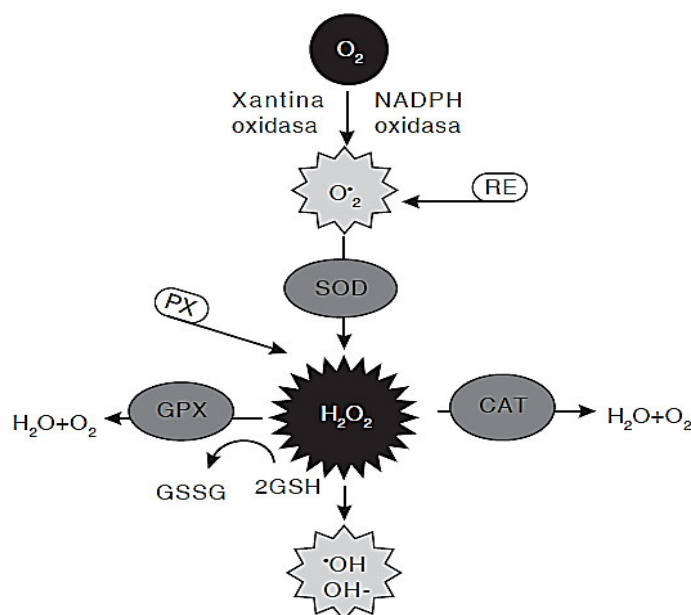


Figura 5. Mecanismo general de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno⁸.

En la figura 5 la oxidación del oxígeno (O_2) por acción del metabolismo celular tiene como producto el ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$); generado por los procesos metabólicos del retículo endoplásmico (RE) y xenobióticos. El $O_2^{\bullet-}$ es degradado por la enzima superóxido dismutasa (SOD), produciendo peróxido de hidrógeno H_2O_2 el cual también es generado por los peroxisomas (PX). El H_2O_2 es sustrato de la enzima glutatión peroxidasa (GPX) que emplea como cofactor a dos moléculas de glutatión reducido (GSH) oxidándolo a (GSSH) en la reacción, para reducir el H_2O_2 a agua (H_2O). La catalasa (CAT) es otra enzima que emplea como sustrato al H_2O_2 reduciéndolo a H_2O ⁸.

2.2.3.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como el desbalance entre la producción de las EROs y la defensa antioxidante el cual provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular^{44,47,57,58}.

El estrés oxidativo puede provenir de:

- Una deficiencia del sistema de defensa antioxidante.
- Un incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno, cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN, degradación proteica.

El aumento de varios de estos agentes oxidantes a la vez, provoca cambios biológicos de manera progresiva en el organismo, siguiendo más o menos un patrón común y la acumulación progresiva de estos cambios ocasiona la enfermedad⁸.

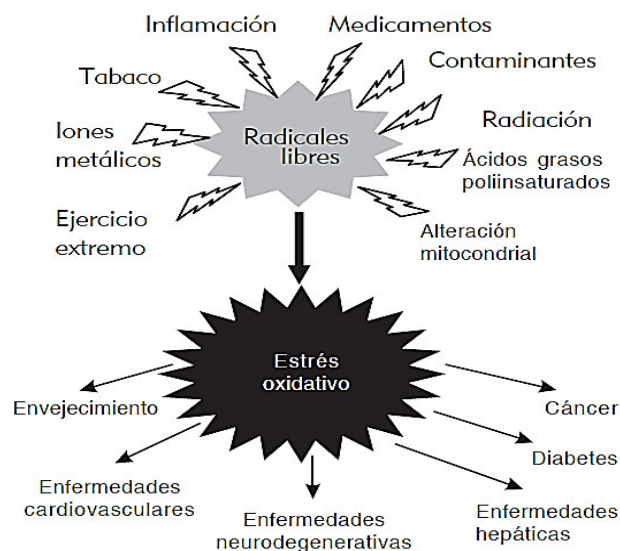


Figura 6. Generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo⁸.

2.2.3.4. Estrés oxidativo por detenimiento

El estrés puede definirse como modificaciones físicas y psicológicas que alteran la homeostasis y el equilibrio de los organismos. El estrés es conocido como una de las razones más importantes de varias enfermedades. Recientemente se han asociado varios modelos de estrés con una mayor generación de radicales libres y alteración en las actividades de enzimas antioxidantes^{14,16}.

Estas alteraciones se explican como un mecanismo de resistencia a los efectos negativos de las especies reactivas de oxígeno (EROs). La lesión de la membrana después de la peroxidación lipídica provoca la alteración de la integridad del tejido⁵⁹. Por lo tanto, para neutralizar las EROs, el cuerpo utiliza principalmente superóxido dismutasa (Cu, Zn-SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Se-GSH-Px) y antioxidantes no enzimáticos como Glutatión reducido (GSH)¹⁶. Se ha informado de que el estrés de inmovilización es un método fácil y conveniente para inducir tanto la tensión psicológica (reacción de escape) como el estrés físico (trabajo muscular), lo que resulta en una movilidad y agresividad restringida⁶⁰, es decir un estrés psicofisiológico típico, el cual induce la formación de EROs y conduce a la peroxidación¹⁶.

2.2.4. Acción analgésica

La analgesia es considerada imprescindible, especialmente cuando se trata de dolor de tipo crónico, donde toda situación álgica debe someterse a una estrategia analgésica previa, antes de aplicarle el correspondiente tratamiento frente al dolor. Dentro de los grupos analgésicos tenemos a: Fármacos Analgésicos opiáceos (O. débiles o menores, O. mayores y O. de acción mixta); Fármacos analgésicos-antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Éstos representan el grupo de analgésicos más utilizados de forma rutinaria en el ámbito hospitalario y extrahospitalario, si bien a menudo se confunde la eficacia antiflogística y analgésica de los mismos⁶¹.

La eficacia analgésica es, en general, de grado moderado a medio, lo que significa que los AAP/AINEs son capaces de aliviar un número elevado de

dolores y molestias de carácter muy diverso: cefaleas, artralgias de variada etiología, mialgias, tendinitis, dismenorreas, dolores dentarios, dolores postoperatorios y postraumáticos de intensidad moderada, ciertos cólicos (p. ej. renales), dolores oncológicos en sus fases iniciales.

Su efecto antiálgico máximo es claramente inferior al que se obtiene con dosis óptimas de analgésicos opiáceos y aunque este efecto es dosis dependiente, el máximo de eficacia antiálgica de los AINEs se consigue al duplicar, en algunos casos triplicar, la dosis del fármaco, no produciéndose incrementos de la actividad antiálgica al aumentar más la dosis de los AINEs. Su utilización preferente es el dolor con etiología somática, intensidad moderada y cierto componente inflamatorio. Escasamente eficaces en dolor neuropático (neuralgias de diversa índole)⁶².

La acción analgésica de los AINEs tiene lugar tanto en los tejidos periféricos como en el SNC. A nivel periférico, mediante inhibición de la síntesis de las prostaglandinas producidas por ambas isoformas de la COX, en respuesta a una agresión o lesión tisular; impiden de ese modo que las PG contribuyan, mediante su acción sensibilizadora sobre las terminaciones nerviosas nociceptivas, a aumentar la acción estimulante dolorosa de otros mediadores allí liberados (histamina, bradiquinina, etc.). En el SNC, en aquellas situaciones que originan sensibilización espinal como consecuencia de una estimulación sostenida de aferencias nociceptivas periféricas, el efecto analgésico o antihiperálgico de los AINEs parece depender de la inhibición preferente de la forma constitutiva de la COX-2. Es posible que en la acción analgésica del paracetamol intervenga su actividad anti-COX-3 ^{61,63}.

2.2.4.1. Mecanismos de analgesia

Debido a sus múltiples etiologías y mecanismos, el dolor sigue siendo un problema no resuelto. Los tratamientos farmacológicos convencionales se basan en: a) La interacción con receptores de membrana (p.ej. opioides), b) La inhibición de enzimas que participan en la síntesis de transmisores (p.ej. AINEs) y c) la manipulación farmacológica de los gradientes aniónicos en la interfase, tanto a nivel del sistema nervioso central como periférico⁶³.

Todos estos fármacos inhiben la actividad de la ciclooxigenasa. Esta enzima convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos (PGG2 y PGH2), los cuales se transforman en prostaglandinas, prostaciclina y/o tromboxanos⁵⁹. Siendo estos los que participan en los fenómenos inflamatorios, ejerciendo un efecto de bronco constricción y vasodilatación, como también en el incremento de la permeabilidad capilar⁶⁴.

El mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), es la inhibición de la ciclooxigenasa. Como consecuencia se inhibe la formación de prostaglandinas (PGE y PGL) a partir del ácido araquidónico membranario de distintos tipos celulares. Se han identificado 2 isoformas, la COX-1 y COX-2⁶⁵.

Sin embargo, el mecanismo íntimo de inhibición es diferente entre ellos: el ácido acetil salicílico es un inhibidor irreversible, por acetilación de un residuo de serina del centro activo; los AINEs inhiben a la ciclooxigenasa de forma competitiva y estereoespecífica, por tanto de forma reversible, siendo el grado de reversibilidad variable entre ellos. La COX-1 se expresa constitutivamente en ciertos tejidos incluyendo estómago, intestinos, riñones, y en las plaquetas; por el contrario, la COX-2 se expresa constitutivamente en un número limitado

de tejidos, incluyendo el cerebro, el riñón y el aparato reproductor. Se ha demostrado que la COX-2 es la isoforma de la enzima que resulta inducida por los estímulos proinflamatorios, y propuesta como principal responsable de la síntesis de los mediadores prostanoideos del dolor, la inflamación y la fiebre⁶¹.

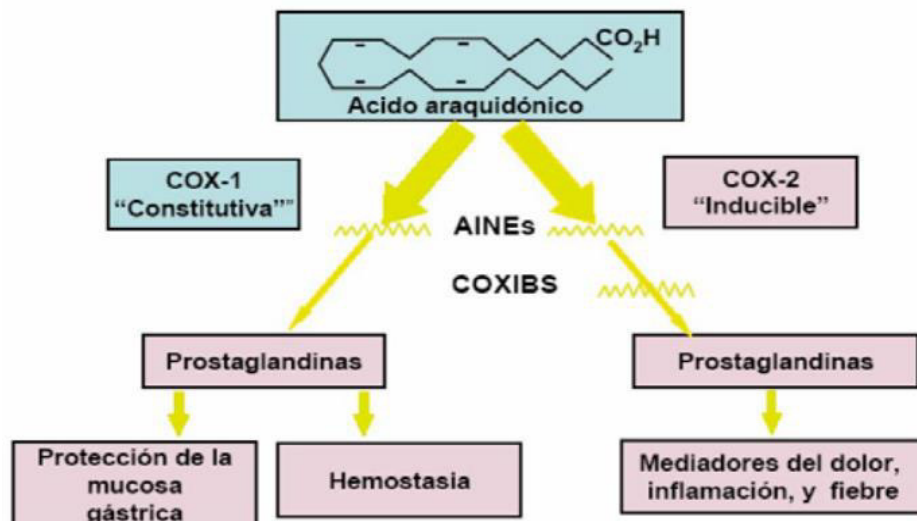


Figura 6. Estructura de la ciclooxygenasa. Mecanismo de acción de los AINEs⁶⁵.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales, equipos y reactivos

3.2.1. Material Biológico

- Ratas albinas (*Rattus norvegicus*) adultas cepa Holtzman, de ambos sexos (3 meses de edad, peso promedio 200-250 g.).
- Ratones albinos (*Mus musculus*) adultos cepa albina Balb. de ambos sexos (peso promedio 25-30 g.)
- Muestra vegetal de hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira".

3.2.2. Equipos

- Molino manual.
- Balanza analítica Mettler (precisión de 0.0001 g.).
- Estufa convección forzada – MEMMERT.
- Potenciómetro Modelo PHS-W (Biolab)
- Pletismómetro Digital LE 7500 – PANLAB.
- Medidor Tail-flick LE 7106 – PANLAB.
- Espectrofotómetro UV-VIS Agilent Cary 8454.

3.2.3. Materiales

- Pipetas Pasteur.
- Sondas orogástricas para rata y ratón.
- Termómetro ambiental.
- Embudo de vidrio.

- Frascos de color ámbar.
- Material volumétrico.
- Cepo para ratas.

3.2.4. Reactivos

- Solución salina estéril 0.9 % (p/v).
- Ibuprofeno USP (LOT: R024X0) .
- Prednisona USP (LOT: O0G356).
- Tramadol (TRAMAL- Grunenthal).
- Vitamina C (L-Ácido Ascórbico - SIGMA-ALDRICH®).
- Butilhidroxitolueno (BHT) SIGMA-ALDRICH®.
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) SIGMA-ALDRICH®.
- Kit para determinar la actividad de la enzima Glutación Peroxidasa (RANSEL-RANDOX)
- Kit para determinar la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (RANSOD-RANDOX).
- Peróxido de hidrogeno 30 %.
- Etanol 96°.
- Agua destilada.

3.2. Métodos y técnicas

3.2.1. Recolección y desecación del material botánico

Se colectaron las hojas de la especie *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” (Fig. 8) en el centro poblado de San Francisco de Pucurhuay, distrito de Ticslacayan, provincia de Pasco a una altitud de 4000-4500 msnm, en el mes de noviembre del 2016. Posteriormente se confirmó su identidad en el Museo de Historia Natural de la UNMSM (Constancia N° 014-USM-2017) (Anexo 1).



Figura 8. Especie botánica estudiada.

La muestra colectada se limpió con alcohol etílico 96° v/v y algodón medicinal para luego secarse en estufa de convección forzada a 39°C por un tiempo de 48 horas. Finalmente, se realizó la molienda en un molino manual.

3.2.2. Obtención del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Para la preparación del extracto se empleó un método similar al descrito por Arroyo et al⁶⁶. Se tomaron 500 gramos de hojas secas-molidas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” y fueron maceradas y

extraídas en 2000 mL de una mezcla de etanol: agua (70:30), por 7 días con agitación diaria, se repitió el procedimiento por 2 veces. El filtrado se concentró hasta sequedad en una estufa de circulación de aire forzada a 39°C obteniéndose así el extracto hidroalcohólico, con el cual se realizó los ensayos fisicoquímicos (solubilidad, marcha fitoquímica, ensayos cromatográficos, determinaciones espectrales), y biológicos (toxicidad y el efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante), así mismo el extracto fue conservado a una temperatura de 1-3°C en frasco ámbar herméticamente cerrado y refrigerado evitando su exposición a la luz solar para prevenir su degradación (Anexo 3).

3.2.3. Preparación de los animales de laboratorio

Se emplearon ratas (*Rattus norvegicus*) cepa Holtzman de 200 a 250 g de peso y ratones cepa Balb entre 25 – 30 g de peso, todos en buen estado de salud, adquiridos en el Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Anexo 2), los que fueron alojados en jaulas metálicas de crianza para su aclimatación por una semana previa a los ensayos, con agua y alimento *ad libitum*. La temperatura ambiental fue de 22-27 °C y 70-80 % de humedad relativa con 12 horas de luz/oscuridad. La investigación se llevó a cabo cumpliendo debidamente las normas de ética para el uso de animales de experimentación (según Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio - Ética de la experimentación animal. MINSA–INS)⁶⁷.

3.2.4. Ensayos fisicoquímicos

3.2.5.1. Determinación de la solubilidad

Se utilizó como muestra problema 10 mg de extracto hidroalcohólico seco al que se agregó un mL de solvente. Los solventes utilizados fueron: n-hexano, éter etílico, diclorometano, cloroformo, metanol, agua, butanol y etanol⁶⁸ (Anexo 4).

3.2.5.2. Marcha fitoquímica.

Tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios de la especie vegetal^{68, 69} (Anexo 5).

Detección de alcaloides

Se utilizó 50 mg de extracto libre de solvente, fueron agitados con diez mL de ácido clorhídrico diluido y posteriormente fueron filtrados. El filtrado se ensayó cuidadosamente con varios reactivos para la identificación de alcaloides como:

- **Prueba de Dragendorff**

A tres mL de filtrado, se añadió un mL de reactivo de Dragendorff. Un precipitado amarillo prominente indica que la prueba es positiva.

- **Prueba de Mayer**

A dos mL de filtrado, se añadieron dos gotas de reactivo de Mayer por las paredes del tubo de ensayo. Un precipitado blanco o cremoso indica que la prueba es positiva.

- **Prueba de Popoff**

A dos mL de filtrado, se añadieron dos gotas de reactivo de Popoff por las paredes del tubo de ensayo. Un precipitado amarillo indica que la prueba es positiva.

Detección de componentes fenólicos y taninos

- **Reacción de Shinoda: detección de flavonoides**

El extracto (50 mg) se disolvió en cinco mL de agua y se añadió fragmentos de magnesio metálico y ácido clorhídrico concentrado (gota a gota). Si se desarrolla color rosado a carmesí, se deduce la presencia de flavonol-glucósidos.

- **Prueba Salkowski: flavonoides con núcleo esteroidal**

Se tomó 50 mg de muestra en un mL de cloroformo, se disolvió en un mL de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva flavonas y flavonoles si se observaran coloraciones amarillas; para flavonas coloraciones naranja-guinda, para chalconas coloraciones rojo-azuloso, y la presencia de quinonas se detecta con coloraciones rojo-púrpura.

- **Prueba de cloruro férrico: compuestos fenólicos**

El extracto (50 mg) se disolvió en cinco mL de agua destilada y se le añadió cuatro gotas de solución de tricloruro férrico al 5 % neutro. Un color verde oscuro indica la presencia de compuestos fenólicos.

- **Prueba de Gelatina: detección de taninos.**

El extracto (50 mg) se disolvió en cinco mL de agua destilada y se le añadió dos mL de una soluc. de gelatina (1%) que contiene cloruro sódico al 10 %. El precipitado blanco indica la presencia de compuestos fenólicos.

Detección de fitoesteroles

- **Prueba de Liebermann-Burchard: detección de triterpenoides y esteroides**

El extracto (50 mg) se disolvió en dos mL de anhídrido acético y se le añadió lentamente dos gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes

del tubo de ensayo. Cambios de colores en tonalidades de rojo, azul o verde muestra la presencia de fitoesteroides.

Determinación de carbohidratos

- **Prueba de Molish**

A dos mL de filtrado, se añadieron dos gotas de solución alcohólica de alfa-naftol, se agitó bien la mezcla y se añadió lentamente un mL de ácido sulfúrico concentrado a lo largo de los lados del tubo de ensayo y se dejó reposar. Un anillo violeta indica la presencia de carbohidratos.

Detección de glicósidos

Se hidrolizaron 50 mg de extracto con ácido clorhídrico concentrado durante 2 horas en un baño de agua, se filtró y el hidrolizado se sometió a los siguientes ensayos.

- **Prueba de Baljet: detección de lactonas**

Se utilizó dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse. Solución A: se coloca un gramo de ácido pícrico en 100 mL de etanol. Solución B: Se agregan diez gramos de NaOH en 100 mL de agua. Para la prueba se agregó 100 µL de la muestra y tres gotas del reactivo. La prueba es positiva si adquiere una coloración naranja o rojo oscuro.

- **Prueba de Borntrager: detección de quinonas**

A dos mL de hidrolizado filtrado, se añadieron tres mL de cloroformo y se agitaron, se separa la capa de cloroformo y se le añadió la solución de amoníaco al 10 %. El color rosa indica la presencia de glicósidos.

- **Prueba de Keller-Killiani: detección de desoxiázucars**

Se tomó un mL de muestra y se disolvió en dos mL de reactivo de Keller, luego se agregó por las paredes del tubo dos mL de reactivo de Killiani. En la zona de contacto de los dos líquidos se produce un anillo color rosa o rojo pardo.

Detección de aminoácidos libres

El extracto (100 mg) se disolvió en diez mL de agua destilada y se filtró a través de un papel de filtro, el filtrado se sometió a la prueba para aminoácidos libres.

- **Prueba de Ninhidrina**

Se añadió dos gotas de solución de Ninhidrina (10 mg de ninhidrina en 200 mL de acetona) a dos mL de filtrado acuoso. Un color púrpura característico indica la presencia de aminoácidos.

Detección de saponinas

El extracto (50 mg) se diluyó con agua destilada y se completó hasta 20 mL. La suspensión se agitó en una probeta durante 15 min. Una capa de espuma mayor a dos centímetros indica la presencia de saponinas.

3.2.5.3. Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas comerciales de sílica gel 60 GF 254 Merck, de 10 cm x 10 cm x 0,25 mm y placas de 20 x 20 cm x 0,25 mm con un indicador fluorescente. Las placas se desarrollaron en el sistema de fase móvil de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (36:12:5). Se utilizó una técnica ascendente con desarrollo simple. El extracto seco se disolvió en agua y posteriormente se extrajo con acetato de etilo, la porción de acetato de etilo fue evaporada hasta sequedad y luego se reconstituyó con metanol para su

posterior sembrado en la placa cromatográfica. Para la identificación de las manchas se utilizó una lámpara UV con posibilidad de hacer observaciones de fluorescencia a 254 y 366 nm. Los metabolitos secundarios encontrados fueron separados (por raspado) y disueltos con metanol absoluto, luego se filtró y las alícuotas obtenidas se emplearon en la identificación de posibles metabolitos mediante Espectroscopia UV-Visible. (Anexo 6)

Las fracciones que presentaron fluorescencia frente al UV a 366 nm se llevaron al análisis espectrofotométrico UV, finalmente se analizó los espectros UV de estas fracciones y permitió identificar dos posibles metabolitos flavonoidales y compararlos con una tabla de referencia⁷⁰.

3.2.5. Ensayos biológicos

3.2.5.1. Toxicidad oral aguda

Se aplicó el Test N° 423, método de la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD)⁷¹. Se siguió el procedimiento utilizado para una dosis inicial de 2000 mg/kg.

En la primera fase del ensayo se utilizaron 3 ratas hembras a las cuales se le administraron por vía oral una dosis de 2 000 mg/kg de extracto. Para la segunda fase del ensayo se utilizan 3 ratas hembras, de acuerdo al resultado obtenido se procedió según el Anexo 7.

La administración de los extractos se realizó, previo ayuno de 16 h, concluida la administración, las ratas fueron observadas a los 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 12 horas, después todos los días hasta los 14 días; asimismo se controló el peso corporal todos los días y se registró la aparición y duración de cualquier signo de toxicidad.

3.2.5.2. Efecto antiinflamatorio

El efecto antiinflamatorio fue evaluado mediante el modelo biológico de edema plantar inducido por carragenina descrito por primera vez por Winter and Porter⁷² en el año 1957, posteriormente modificado por Sughisita et al.⁷³ en el año 1981.

Se emplearon 36 ratas albinas de 200 ± 20 g de peso corporal, sometidas a ayuno 12 horas antes de iniciar el ensayo, con agua *ad libitum* y distribuidas aleatoriamente en seis grupos de seis ratas cada uno, y tratados vía oral de la siguiente manera:

Tabla 3. Grupos en estudio para la evaluación del efecto antiinflamatorio

| | | |
|---------|---------------|--|
| Grupo 1 | Control | Solución de CMC al 0,13 %. |
| Grupo 2 | Estándar 1 | Ibuprofeno 120 mg/kg de peso corporal por V.O. |
| Grupo 3 | Estándar 2 | Prednisona 1,2 mg/kg de peso corporal por V.O. |
| Grupo 4 | Tratamiento 1 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira" 100 mg/kg de peso corporal por V.O. |
| Grupo 5 | Tratamiento 2 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira" 250 mg/kg de peso corporal por V.O. |
| Grupo 6 | Tratamiento 3 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira" 500 mg/kg de peso corporal por V.O. |

Media hora después se inyectó 0,1 mL de carragenina al 1 % en la aponeurosis subplantar de la pata derecha. El diámetro de la pata inyectada fue controlado a las 0, 1, 2, 3, 5 y 7 horas después de inducir la inflamación y aplicar los tratamientos usando un pletismómetro digital (Anexo 8).

El porcentaje de inhibición de la inflamación de cada grupo (n= 6) fue obtenido como sigue:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(\frac{(\text{Ct} - \text{Co})_{\text{control}} - (\text{Ct} - \text{Co})_{\text{tratado}}}{(\text{Ct} - \text{Co})_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Donde Ct es el volumen desplazado en un tiempo t después de la administración de la carragenina y Co es el volumen desplazado antes de la administración de la carragenina.

3.2.5.3. Efecto analgésico.

Se realizó una exploración del dolor con la prueba de retirada de la cola (Tail Flick Test)^{74,75}, en la cual se utiliza calor irradiado, haciendo incidir un haz de luz en la unión del tercio distal y medio de la cola del roedor, y finaliza cuando el roedor retira la cola, midiendo el tiempo de latencia.

Se realizó una prueba de respuesta en cola de los animales para ajustar la intensidad de la fuente de calor capaz de producir una latencia de 3 a 4 segundos, además se utilizó un tiempo de corte de 10 segundos para minimizar el riesgo de daño tisular.

La medición del período de latencia (tiempo que el animal es capaz de soportar la radiación) se realizó de la manera siguiente: la primera medición fue previa a la administración y la segunda 30 minutos después de la administración de las sustancias en estudio (Anexo 9).

Se trabajó con los siguientes grupos experimentales cada uno conformado por 8 ratones albinos adultos cepa albina Balb. y peso promedio 25-30 g descritos en la tabla 4.

Tabla 4. Grupos en estudio para la evaluación del efecto analgésico.

| | | |
|---------|---------------|---|
| Grupo 1 | Control | Suero fisiológico por vía orogástrica (V.O.), 0,1 mL/10 g de peso corporal. |
| Grupo 2 | Estándar | Tramadol 10 mg/kg de peso corporal por V.O. |
| Grupo 3 | Tratamiento 1 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” 400 mg/kg de peso corporal por V.O. |
| Grupo 4 | Tratamiento 2 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” 800 mg/kg de peso corporal por V.O. |
| Grupo 5 | Tratamiento 3 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” 1200 mg/kg de peso corporal por V.O. |

Los datos generados utilizando la prueba Tail-flick se expresan como el porcentaje de efecto máximo posible (EMP) de analgesia:

$$\% \text{ EMP} = \frac{(\text{latencia post administracion} - \text{latencia basal})}{(\text{tiempo de corte (10 seg)} - \text{latencia basal})} \times 100$$

3.2.5.4. Actividad antioxidante *in vitro*

Se utilizó el método de barrido de radicales libres difenilpicrilhidrazilo (DPPH) según lo descrito por Brand-Williams et al.⁷⁶. El DPPH se caracteriza por ser un radical estable gracias a la deslocalización de su electrón libre y su color violeta oscuro que posee una banda de absorción de 520 nm aproximadamente cuando se encuentra disuelto en metanol⁷⁷.

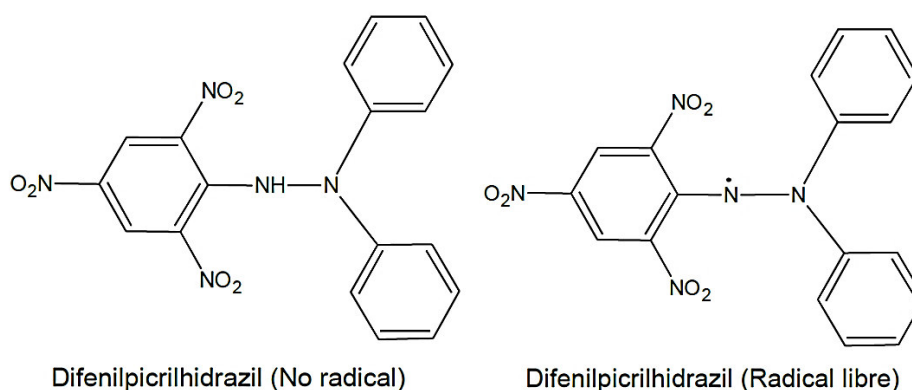
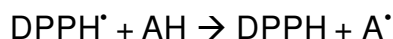


Figura 9. Estructura del DPPH en su forma radical y no radical⁷⁷.

Cuando una solución de DPPH se mezcla con una solución donadora de protones como un antioxidante, el radical se reduce perdiendo la intensidad de color y su absorbancia dándose la siguiente reacción:



Procedimiento:

Se preparó la solución stock de DPPH 20 mg/L usando como disolvente metanol, posteriormente esta solución fue ajustada a $0,7 \pm 0,01$ de absorbancia en un espectrofotómetro Agilent Cary 8454 a 517 nm. El extracto fue evaluado por triplicado, a diferentes concentraciones de 0.5, 1, 25, 50, 100 y 200 µg/mL, utilizando como fármacos control, vitamina C y butilhidroxitolueno (BHT). La absorbancia a 517 nm fue determinada 30 minutos después de iniciada la reacción (Anexo 10).

Tabla 5. Esquema de trabajo para el ensayo de antioxidantes (DPPH).

| | Blanco de muestra | Patrón de referencia | Muestra o estándar |
|---|-------------------|----------------------|--------------------|
| Metanol | 1 500 µL | 750 µL | --- |
| Muestra | 750 µL | --- | 750 µL |
| DPPH | --- | 1 500 µL | 1 500 µL |
| Reposar por 30 minutos en oscuridad. Leer a 517 nm. | | | |

Se calculó el % de inhibición (% *Inh*) de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$\% Inh = \left[1 - \left(\frac{A1 - A2}{A3} \right) \right] \times 100$$

A1= Absorbancia de la muestra o estándar

A2= Absorbancia del blanco de muestra

A3= Absorbancia del patrón de referencia

3.2.5.5. Actividad antioxidante *in vivo*

Se utilizaron 30 ratas albinas adultas (*Rattus norvegicus*) de cepa Holtzman con peso promedio de 200-250 g, las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en cinco grupos de seis ratas cada uno, administrando el extracto a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de peso por vía oral durante 10 días. Treinta minutos después de la administración de los tratamientos los animales fueron sometidos a estrés por inmovilización según el método de Inue et al⁷⁸, para lo cual se los colocó en cepos individuales de inmovilización (Anexo 11) durante 4 horas al día durante 10 días.

Tabla 6. Grupos en estudio para la evaluación de la actividad antioxidante *in vivo*.

| | | |
|---------|---------------|---|
| Grupo 1 | Blanco | Suero fisiológico por vía orogástrica (V.O.), 0,1 mL/10 g de peso corporal. |
| Grupo 2 | Estrés | Suero fisiológico por V.O. + Estrés por inmovilización. |
| Grupo 3 | Tratamiento 1 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” 100 mg/kg de peso corporal por V.O. + Estrés por inmovilización. |
| Grupo 4 | Tratamiento 2 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” 200 mg/kg de peso corporal por V.O. + Estrés por inmovilización. |
| Grupo 5 | Tratamiento 3 | Extracto hidroalcohólico de <i>Senecio canescens</i> (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” 300 mg/kg de peso corporal por V.O. + Estrés por inmovilización. |

Al culminar los 10 días de ensayo los animales fueron anestesiados con éter etílico y se extrajo **5 ml de sangre por punción cardiaca de cada uno** (Anexo 12) y cada muestra de sangre fue utilizada para determinar la actividad de los marcadores biológicos: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (MDA).

3.2.5.5.1. Determinación de la Actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

Método

Se utilizó el kit comercial RANSOD de la casa comercial RANDOX, basado en el método de Mc Cord y Fridovich⁷⁹.

La función de la superóxido dismutasa (SOD) es acelerar la dismutación de un radical tóxico, el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), producido durante un proceso oxidativo enérgico, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

Este método emplea Xantina y Xantin oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa por el grado de inhibición de esta reacción. Una unidad de SOD es la que causa un 50 % de inhibición del valor de reducción de INT bajo las condiciones del análisis.

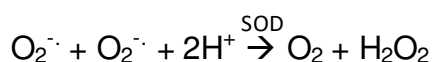


Tabla 7. Composición de los reactivos RANSOD para determinar la actividad de SOD.

| | Componentes | Concentraciones iniciales de las Soluciones |
|---------------------|--------------------------|---|
| R1a. Sustrato mixto | Xantina I.N.T. | 0,05 mmol/l 0,025 mmol/l |
| R1b. Tampón | CAPS EDTA | 40 mmol/l, pH 10,2 0,94 mmol/l |
| R2. CAL | Xantín Oxidasa Patrón | 80 U/l 5,24 U/mL |
| Diluyente | Tampón Fosfato | 0,01 mol/l, pH 7,0 |

Nota: Sustrato mixto (R1)= sustrato mixto (R1a)+ Tampon (R1b)

Preparación de muestra

Se utilizó muestras de sangre entera con EDTA. Se centrifugó 0,5 mL de sangre entera durante 10 min a 3 000 rpm después se aspiró el plasma.

Se lavó los eritrocitos 4 veces con tres mL de solución de NaCl al 0,9 %, centrifugando durante 10 min a 3 000 rpm después de cada lavado.

El centrifugado lavado de eritrocitos se completó con dos mL de agua bidestilada fría. Luego se mezcló y dejó reposar durante 15 min a 4°C. El lisado se diluyó con 0,01 mol/L de Tampón Fosfato pH 7,0, de forma que el porcentaje de inhibición caiga entre el 30 y el 60 %.

Preparación de patrones

Tabla 8. Preparación de patrones para curva de calibración SOD.

| Patrón | Concentración | Volumen de solución patrón | Volumen de diluyente |
|--------|---------------|----------------------------|----------------------|
| S6 | 5.24 U/mL | Patrón neto | - |
| S5 | 2.62 U/mL | 5 mL de S6 | 5 mL |
| S4 | 1.31 U/mL | 5 mL de S5 | 5 mL |
| S3 | 0.655 U/mL | 5 mL de S4 | 5 mL |
| S2 | 0.218 U/mL | 3 mL de S3 | 6 mL |

Procedimiento

Las muestras y los patrones (S2-S6) se analizaron siguiendo lo descrito en la tabla, con los resultados obtenidos de los patrones se graficó una curva de calibración.

Tabla 9. Protocolo de análisis para determinar la actividad de SOD.

| | Muestra | Patrones (S2-S6) | Muestra diluyente |
|--|------------------------|------------------|-------------------|
| Muestra | 20 µL | --- | --- |
| Patrón | --- | 20 µL | --- |
| Diluyente | --- | --- | 20 µL |
| Sustrato mixto (R1) | 680 µL Mezclar bien | 680 µL | 680 µL |
| Xantina Oxidasa (R2) | 100 µL Mezclar bien | 100 µL | 100 µL |
| Condiciones de trabajo: T° 37°C; 505 nm; Tiempo 1= 30 seg ; Tiempo 2: 3 min. | | | |

Cálculos

Índice de Muestra ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$)

$$\Delta\text{Abs}/\text{min de patrón o de muestra} = \frac{\text{Abs}(t_2) - \text{Abs}(t_1)}{3}$$

Índice de muestra diluyente (Índice S1) = Índice de reacción sin inhibir = 100 %

Porcentaje de Inhibición (% Inh)

Todos los índices tanto de los patrones como de las muestras fueron convertidos en porcentajes del índice del diluyente de muestra y sustraídos del 100 % para obtener un porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ Inh} = 100 - \left[\frac{\Delta\text{Abs patrón o muestra}/\text{min} \times 100}{\Delta\text{AbsS1}/\text{min}} \right]$$

Se utilizó el porcentaje de inhibición de la muestra para obtener las unidades de SOD de la curva patrón, la cual se obtuvo por regresión lineal relacionando la concentración de la actividad de SOD (U/mL) y porcentaje de inhibición (% Inh.). Con el fin de obtener una función lineal se trabajó con el logaritmo de U SOD/mL.

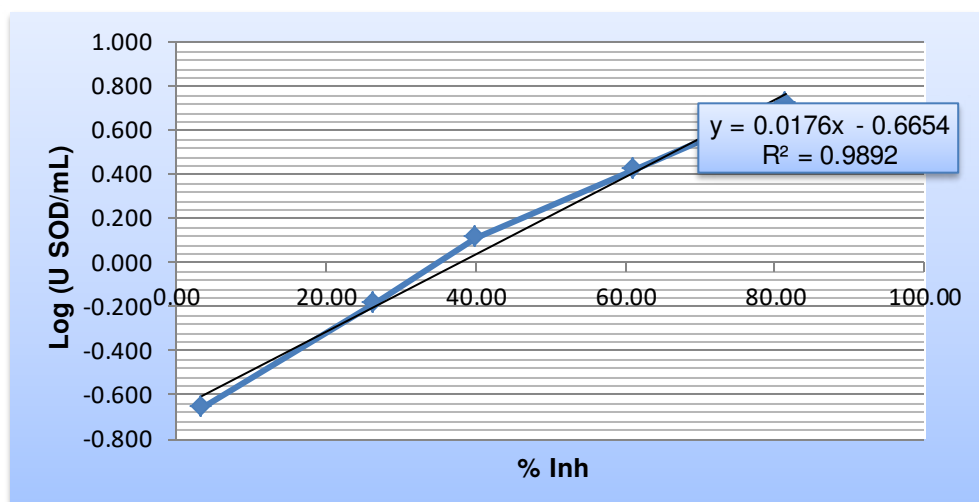


Figura 10. Curva de calibración para la determinación de la actividad de SOD.

U SOD/ml de sangre entera = U SOD en la curva patrón/ml x Factor Dilución

3.2.5.5.2. Determinación de la Actividad de la enzima Glutación Peroxidasa (GPx)

Método

Se utilizó el kit comercial RANSEL de la casa comercial RANDOX, basado en el método de Plagia y Valentine⁸⁰. Este método se fundamenta en la oxidación de la glutatión (GSH) por el hidroperóxido de cumeno catalizado por la GPx; en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH, el glutatión oxidado (GSSG) es inmediatamente convertido a su forma reducida con la concomitante oxidación de NADPH a NADP⁺, midiéndose la disminución de absorbancia a 340 nm por la desaparición de NADPH.

GPX



GR

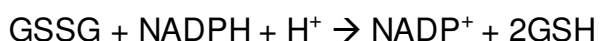


Tabla 10. Composición de los reactivos RANSEL para determinar la actividad de GPx.

| Componentes | | Concentraciones iniciales de las Soluciones |
|------------------|-------------------------|---|
| R1a. Reactivo | Glutation | 4 mmol/l |
| | Glutation Reductasa | $\geq 0,5$ U/l |
| | NADPH | 0,34 mmol/l |
| R1b. Tampón | Tampón fosfato | 0,05 mol/l, pH 7,2 |
| | EDTA | 4,3 mmol/l |
| R2. | Hidroperóxido de cumeno | 0,18 mmol/l |
| | Fosfato Potásico | 10,3 mmol/l |
| Diluyente | Ferricianida Potásica | 6.08 mmol/l |
| | Cianida Potásica | 7,68 mmol/l |
| | Surfactante | 0.1% v/v |

Nota: Reactivo R1= Reactivo (R1a)+ Tampon (R1b)

Preparación de muestra

Se utilizó sangre entera con EDTA, se tomó 0,05 mL de muestra la cual se diluyo con dos mL de diluyente RANSEL.

Procedimiento

Las muestras se analizaron siguiendo lo descrito en la tabla 11.

Tabla 11. Protocolo de análisis para determinar la actividad de GPx

| | Muestra | Blanco |
|---|-------------|-------------|
| Muestra | 10 μ L | --- |
| Agua destilada | --- | 10 μ L |
| Reactivo R1 | 500 μ L | 500 μ L |
| Hidroperóxido de cumeno (R2) | 20 μ L | 20 μ L |
| Condiciones de trabajo: T° 37°C; 340 nm; T1= 1 min ; T2: 2 min; T3: 3 min | | |

Cálculos

$$U/L \text{ de hemolizado} = 8\,412 \times \Delta A \, 340 \, \text{nm/minuto}$$

3.2.5.5.3. Determinación de la Actividad de la enzima Catalasa (CAT)

Método

Basado en el estudio de Hugo Aebi⁷⁹ en el año 1984. Se fundamenta en que el peróxido de hidrógeno, en el rango ultravioleta, muestra un continuo

incremento de absorción al disminuir la longitud de onda. La descomposición del peróxido de hidrógeno puede ser medida directamente por la disminución en la absorbancia a 240 nm. La diferencia en absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la catalasa. Una unidad es definida como la cantidad de enzima que puede descomponer un μmol de H_2O_2 por minuto a 25 °C a un pH = 7. Los resultados se expresan UI CAT/mL sangre.

Preparación de muestra

Se tomó diez μL de eritrocitos lavados, que se hemolizaron con dos mL de agua destilada. Luego se tomó 50 μL del lisado para el análisis.

Procedimiento

Las muestras se analizaron siguiendo lo descrito en la tabla

Tabla 12. Protocolo de análisis para determinar la actividad de CAT

| | MUESTRA | BLANCO |
|---|------------------|--------|
| Muestra | 50 μL | --- |
| Peróxido de hidrogeno 30 mM | 3 mL | 3 mL |
| Condiciones de trabajo: T: 25°C; 240 nm; Medir 0 seg. y cada 15 seg. por 1 min. | | |

Cálculos

$$K_{\text{CAT}}/\text{mL} = \frac{2,3}{\Delta t} \times \log \left(\frac{A_1}{A_2} \right) \times \text{FD} \times 1000$$

Dónde:

K_{CAT}/mL : Actividad de la enzima CAT expresada por mL sangre

Δt : Variación de tiempo (seg)

FD: Factor de dilución

A1: Absorbancia a 240 nm en tiempo 0

A2: Absorbancia a 240 nm en tiempo 15 seg.

3.2.5.5.4. Determinación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico

El contenido de MDA fue determinado como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante el método espectrofotométrico descrito por Hong Yu⁸⁰, el método se basa en la reacción de una molécula de malondialdehído (MDA) con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA); formando un aducto MDA-TBA₂ estable y cuya coloración varía desde el color rosa al color rojo y que absorbe fuertemente a 532 nm.

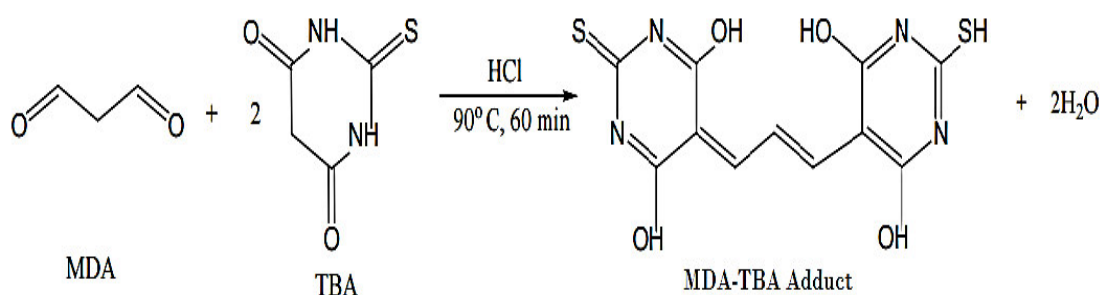


Figura 11. Formación y coloración del aducto MDA-TBA⁸³.

Procedimiento

Se tomó un mL de eritrocitos lavados y se hemolizaron con un mL de agua bidestilada fría. Se dejó reposar en baño de hielo por 15 minutos. Luego se tomó 0,5 mL para la determinación de MDA, se adicionó NaOH para separar el MDA unido a las proteínas, las cuales son precipitadas añadiendo el reactivo ácido tricloracético (ATC). Las sustancias reactantes con el TBA reaccionan formando un compuesto coloreado, dichas sustancias fueron calculadas usando el coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

El TBA reacciona con facilidad con peróxidos de ácidos grasos, por esta razón se adicionó el reactivo butilhidroxitolueno (BHT) para prevenir la autooxidación de ácidos grasos no saturados.

Tabla 13. Protocolo de análisis para determinar TBARS

| | Blanco | Muestra |
|--|----------|----------|
| Hemolizado 50 % | --- | 0,50 mL |
| Agua | 0,50 mL | --- |
| BTH 0.2 % | 0,05 mL | 0,05 mL |
| NaOH10 N | 0,025 mL | 0,025 mL |
| BM a 60°C x 30'. Hielo | | |
| TCA 18 % | 1,2 mL | 1,2 mL |
| Baño de hielo. Centrifugar a 3500 rpm por 10 min | | |
| Sobrenadante | 1,0 mL | 1,0 mL |
| TBA/HCl | 2,0 mL | 2,0 mL |
| Mezclar. Hervir a 95 °C x 30'. Enfriar en hielo. Centrifugar a 6000 g x 10'. | | |
| Leer a 532 nm | | |

Cálculos:

$$[\text{TBARS}] = \frac{(\text{AbsMP} - \text{AbsBL})}{\epsilon} \times \text{FD} \times 10^9 \text{ nmol}$$

Dónde:

TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

AbsMP: Absorbancia de la muestra problema

AbsBL: Absorbancia del blanco

ϵ : Coeficiente de extinción de MDA ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

FD: factor de dilución

3.3. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media (promedio) +/- desviación estándar. La diferencia entre los grupos tratados se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA), considerándose significativo $p < 0,05$. Todo el procedimiento se realizó con el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versión 21.0 en español.

Error típico o estándar de la media

Es el valor que cuantifica cuánto se apartan los valores de la media de la población. Es decir, el error estándar de la media cuantifica las oscilaciones de la media muestral alrededor de la media poblacional. Está relacionado con el intervalo de confianza.

Nivel de significancia (α)

Probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula (H_0) cuando ésta es verdadera (decisión conocida como Error tipo I, o "falso positivo").

- H_0 (hipótesis nula) = No hay diferencia entre ambos tratamientos.
- H_1 (hipótesis alternativa) = Sí existe diferencia.

Intervalo de confianza

Es un rango de valores en el cual se encontraría el valor del parámetro, con una probabilidad determinada. Generalmente se construye intervalos de confianza con 95 % de probabilidad.

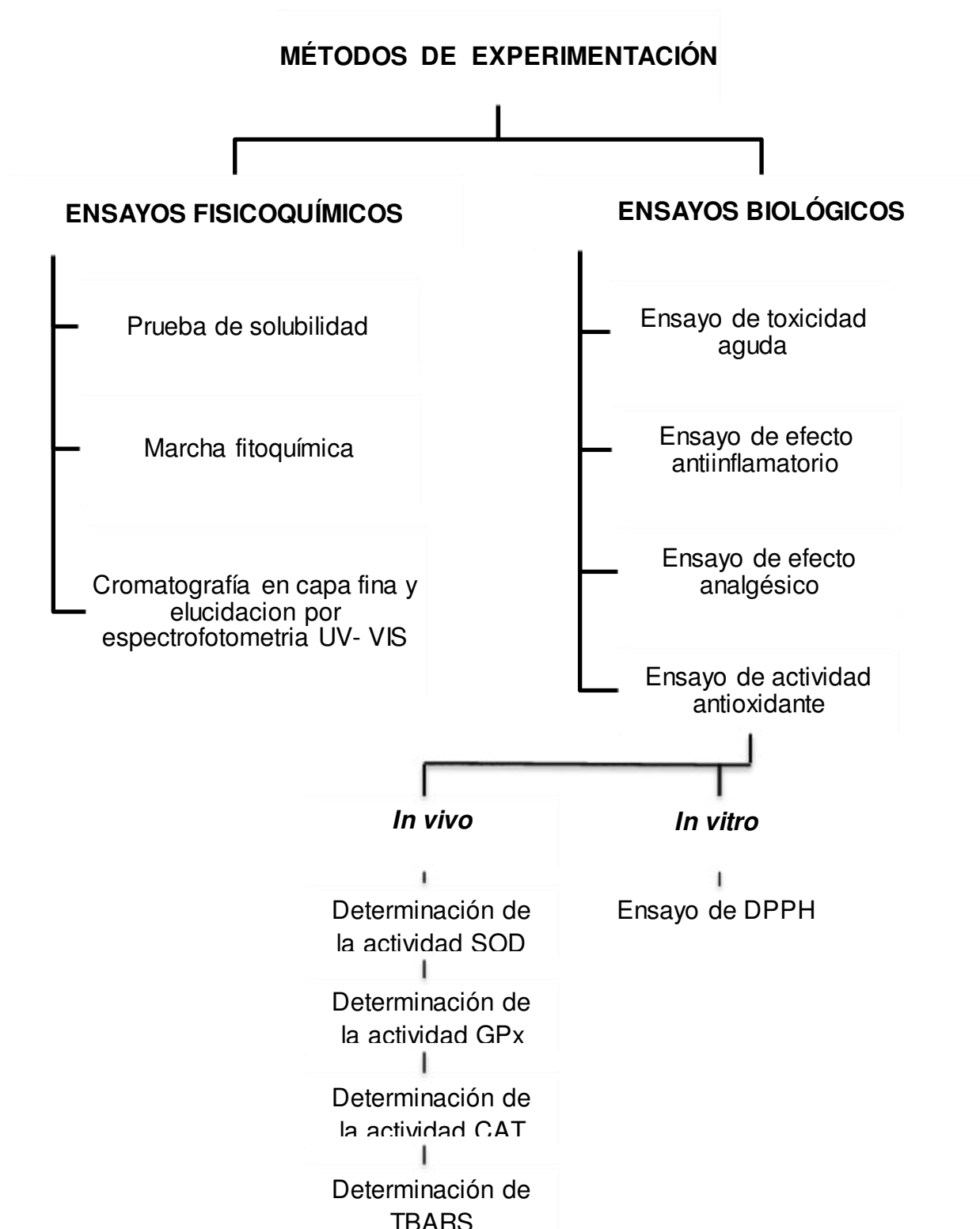


Figura 12. Métodos de experimentación utilizados con el extracto hidroalcohólico en los ensayos fisicoquímicos y biológicos del *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

IV. RESULTADOS

4.1. Pruebas fitoquímicas preliminares

Tabla 14. Solubilidad del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira". 25 °C.

| Solventes | Resultado |
|---------------|-----------|
| n-Hexano | - |
| Éter etílico | - |
| Cloroformo | - |
| Metanol | + |
| Agua | +++ |
| Diclorometano | - |
| Butanol | - |
| Etanol | +++ |

Leyenda: Insoluble (-); Poco soluble (+); Soluble (++);
Muy soluble (+++)

Tabla 15. Análisis Cualitativo Fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

| Metabolitos secundarios | Reacción | Observación | Resultado |
|--------------------------------|----------------------|----------------------------|------------------|
| | Dragendorff | Precipitado rojo | ++ |
| Alcaloides | Mayer | Precipitado blanco | + |
| | Popoff | Precipitado amarillo | + |
| Flavonoides | Shinoda | Coloración roja | +++ |
| Compuestos fenólicos | Tricloruro férrico | Coloración verde | +++ |
| Taninos | Gelatina | Precipitado blanco | ++ |
| Triterpenoides y esteroides | Lieberman-Burchard | Coloración verde azulada | ++ |
| | Molish (alfa naftol) | Coloración violeta | - |
| Lactonas | Baljet A y B | Coloración naranja | - |
| Desoxiazúcares | Keller-Kiliani | Anillo rosa | + |
| Núcleo esteroidal | Salkowski | Coloración amarilla a rojo | +++ |
| Quinonas | Borntrager | Coloración rojo claro | + |
| Aminoácidos libres | Ninhidrina | Coloración morada | - |
| Saponinas | Prueba de Espuma | Espuma > 1 min | +++ |

Leyenda: No se evidencia presencia (-); Presencia de trazas (+); Presencia moderada (++); Presencia abundante (+++)

Se destaca como constituyentes mayoritarios la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas. Esto un indicador favorable y preliminar de los principales efectos farmacológicos que el extracto hidroalcohólico presenta.

Tabla 16. Análisis de las bandas cromatográficas eluidas con metanol y características espectrofotométricas UV/Visible (Anexo 6)

| Eluatos de las fracciones obtenidas por cromatografía | | Bandas espectrales UV | | Metabolitos propuestos |
|---|-----------------------|-----------------------|----------|------------------------|
| Fracción | Color en lámpara UV | Banda I | Banda II | |
| 1 | Amarillo fluorescente | 308 nm | 252 nm | isoflavona |
| 2 | Amarillo fluorescente | 325 nm | 266 nm | Flavona o flavonoles |

Las estructuras propuestas fueron determinadas de acuerdo Al Sistema de identificación planteado por Mabry T. et al.⁷⁰, comparando las bandas espectrales (I y II) obtenidas en el barrido espectral de 200- 600 nm.

4.2. Toxicidad aguda

Tabla 17. Resultados de la ensayo de toxicidad a dosis única.

| | N | Signos de Toxicidad | Animales Muertos | Peso promedio + DS | |
|--------------|---|---------------------|------------------|--------------------|---------------|
| Primera fase | 3 | Ninguno | Ninguno | 0 días | 170,33 ± 4,71 |
| | | | | 7 días | 183,33 ± 5,18 |
| | | | | 14 días | 194,33 ± 3,61 |
| Segunda fase | 3 | Ninguno | Ninguno | 0 días | 201,67 ± 5,02 |
| | | | | 7 días | 213,33 ± 4,70 |
| | | | | 14 días | 224,67 ± 4,32 |

Los resultados expuestos en la tabla 17 demuestran que el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” es no tóxico, no se observó signos toxicidad ni muerte además el peso corporal se comportó acorde a la curva de crecimiento normal.

4.3. Efecto antiinflamatorio

Tabla 18. Resultados de ensayo efecto antiinflamatorio.

| Tratamientos | Volumen (mL) | | | | |
|-------------------------|--------------|------|------|-------|--------|
| Tiempo (horas) | 1 | 2 | 3 | 5 | 7 |
| Grupo 1 (Carragenina) | 1,00 | 1,35 | 1,41 | 1,32 | 1,24 |
| Grupo 2 (Prednisona) | 0,78 | 1,12 | 1,07 | 0,94* | 0,64** |
| Grupo 3 (Ibuprofeno) | 0,70 | 1,13 | 1,13 | 0,88* | 0,73** |
| Grupo 4 (EXT 100 mg/kg) | 0,82 | 1,07 | 1,05 | 0,97* | 0,80** |
| Grupo 5 (EXT 250 mg/kg) | 0,95 | 1,16 | 1,19 | 1,09 | 0,86* |
| Grupo 6 (EXT 500 mg/kg) | 0,78 | 1,15 | 1,09 | 0,95* | 0,77** |

* Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control empleando un ANOVA con post test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (Anexo 13)

En la Tabla 18 se detallan los resultados obtenidos como el promedio de inflamación en mL de la pata trasera al evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

La actividad antiinflamatoria según el modelo de Winter and Porter⁷², evidencia la respuesta a la acción irritante de la carragenina en todos los grupos luego de una hora de ser administrada. Se observa también la tendencia antiinflamatoria en los mismos grupos después de las dos horas de tratamiento.

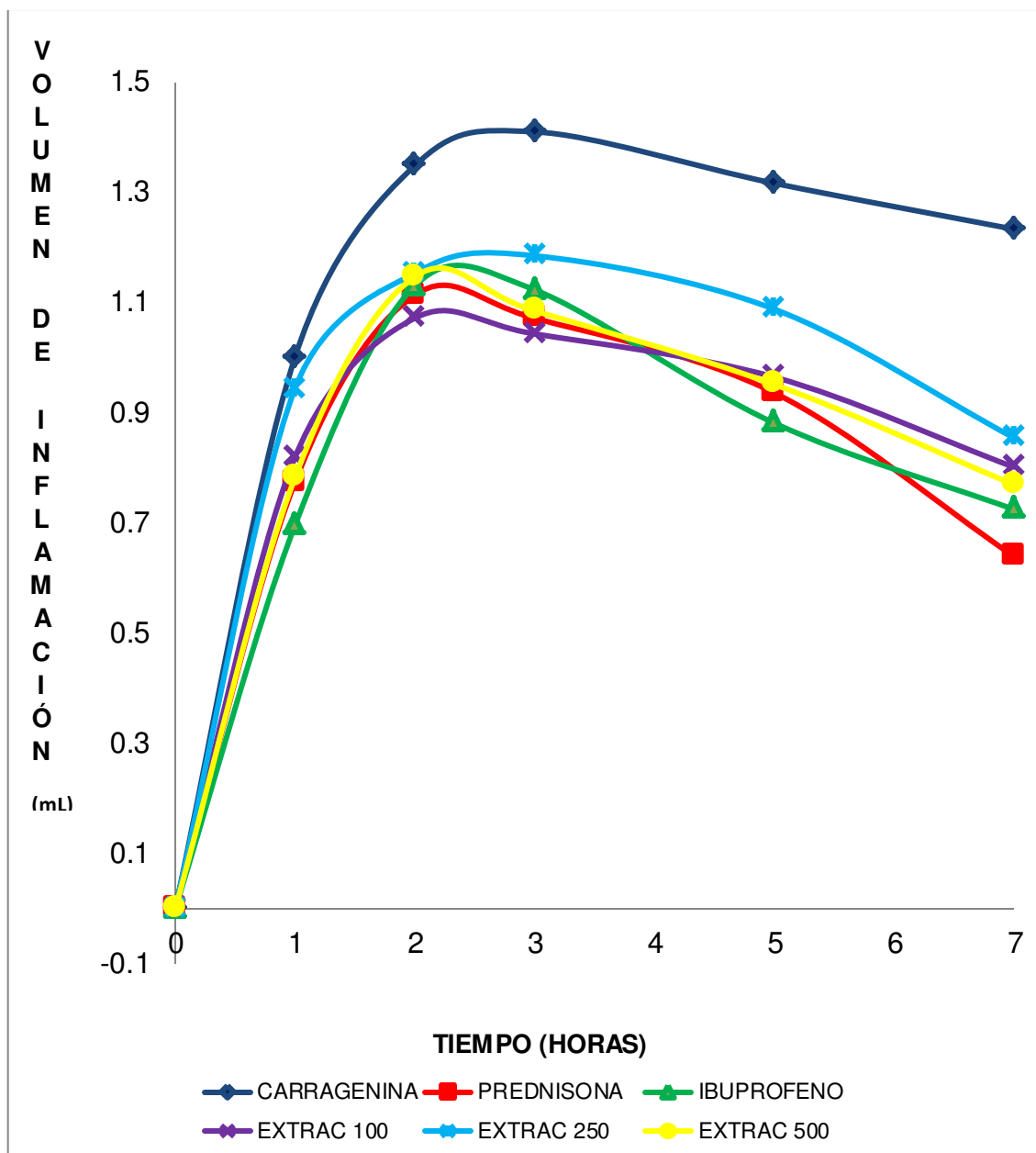


Figura 13. Curva tiempo-efecto promedio del volumen de inflamación para cada tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira".

La acción irritante de la carragenina presenta una etapa de meseta entre las 2 a 3 horas, observándose una disminución considerable de la curva para los extractos y referencias a partir de la primera hora, siendo entre los extractos los de 100 y 500 mg/Kg los de mejores resultados.

Tabla 19. Porcentaje de inhibición de la inflamación con el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira".

| Tratamientos | Tiempo (horas) | | | | |
|--------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 5 | 7 |
| | % de inhibición | | | | |
| Grupo 2 (Prednisona 1,2 mg/kg) | 22,63 | 17,41 | 23,97 | 28,82 | 48,04 |
| Grupo 3 (Ibuprofeno 120 mg/kg) | 30,45 | 16,17 | 20,31 | 33,00 | 41,16 |
| Grupo 4 (EXT 100 mg/kg) | 18,14 | 20,49 | 25,97 | 26,68 | 34,95 |
| Grupo 5 (EXT 250 mg/kg) | 5,66 | 14,44 | 15,94 | 17,32 | 30,63 |
| Grupo 6 (EXT 500 mg/kg) | 21,80 | 14,94 | 23,02 | 27,69 | 37,52 |

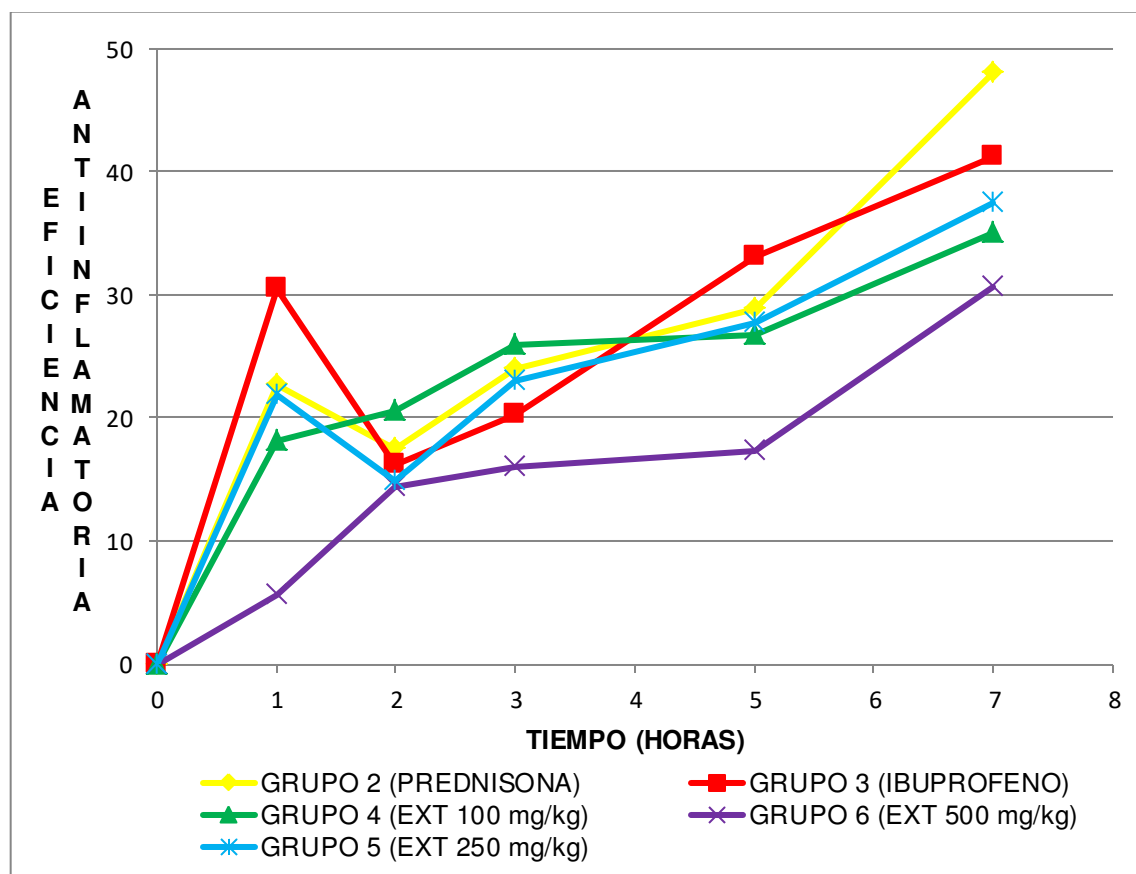


Figura 14. Porcentaje de la eficiencia antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira".

4.4. Efecto analgésico

Tabla 20. Comparación de la actividad analgésica mediante ensayo Tail Flick del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” a diferentes concentraciones y el fármaco de referencia (Tramadol).

| Tratamientos | N | EMP \pm DS | p |
|-----------------------------|---|--------------------|-------|
| Grupo 1 (Basal) | 8 | 3,07 \pm 1,15 * | - |
| Grupo 2 (Tramadol 10 mg/kg) | 8 | 39,67 \pm 2,66 * | 0,000 |
| Grupo 3 (EXT 400 mg/kg) | 8 | 16,65 \pm 2,14 * | 0,000 |
| Grupo 4 (EXT 800 mg/kg) | 8 | 20,84 \pm 1,23 * | 0,000 |
| Grupo 5 (EXT 1200 mg/kg) | 8 | 28,55 \pm 2,10 * | 0,000 |

Dónde:

N: Número de animales tratados

EMP \pm DS: Efecto máximo posible \pm Desviación estándar

p < 0.05 () Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control.

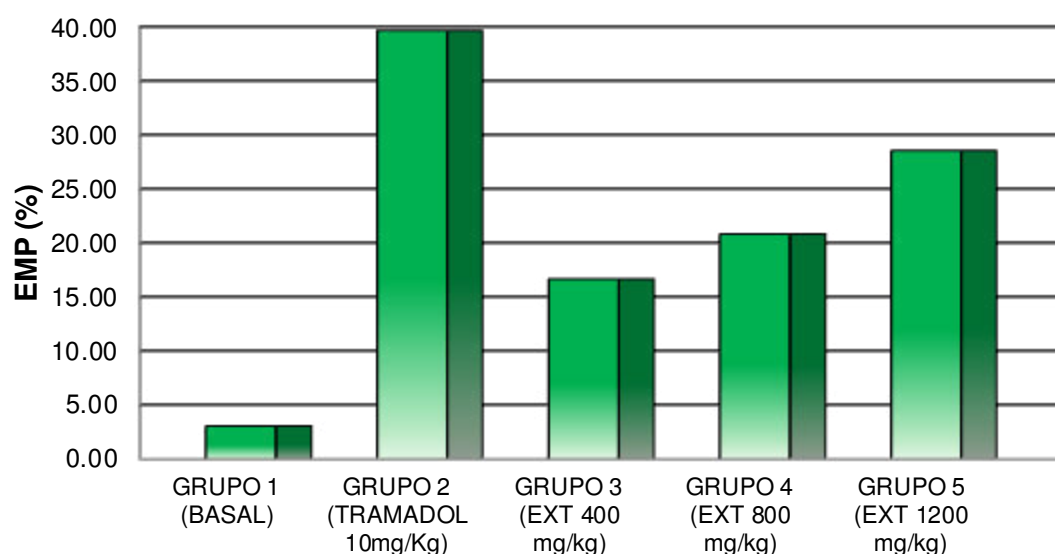


Figura 15. Relación efecto máximo posible – tratamientos del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” diferentes concentraciones y el fármaco de referencia (Tramadol) mediante el ensayo latigazo de la cola (Tail Flick).

Se observa que el extracto presenta un efecto analgésico dosis-dependiente frente al ensayo latigazo de la cola. El efecto máximo del extracto se alcanzó a la concentración de 1200 mg/kg.

4.5. Actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo*

Tabla 21. Capacidad Antioxidante e IC 50 del Extracto Hidroalcohólico *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira".

| Muestra | Conct. (µg/mL) | % Inhibición | IC 50 |
|--|----------------|--------------|-------------|
| Extracto hidroalcohólico de vira- vira | 0,5 | 19,97 | 62,95 µg/mL |
| | 1 | 22,53 | |
| | 25 | 33,69 | |
| | 50 | 45,35 | |
| | 100 | 72,35 | |
| | 200 | 105,60 | |
| Vitamina C | 0,5 | 14,80 | 4,11 µg/mL |
| | 1 | 27,14 | |
| | 5 | 63,41 | |
| | 10 | 95,09 | |
| | 15 | 94,04 | |
| | 20 | 95,01 | |
| BHT | 0,5 | 24,20 | 25,64 µg/mL |
| | 1 | 31,58 | |
| | 10 | 39,60 | |
| | 25 | 49,90 | |
| | 50 | 71,09 | |
| | 100 | 94,85 | |

En la Tabla 21 y Fig. 15 se observa la capacidad antioxidante obtenida a las diferentes concentraciones de 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL de la planta en estudio.

Los resultados de actividad antioxidante son expresados en porcentaje, observándose una relación directa entre la concentración y la capacidad antioxidante, tal como se muestra en las tabla 16.

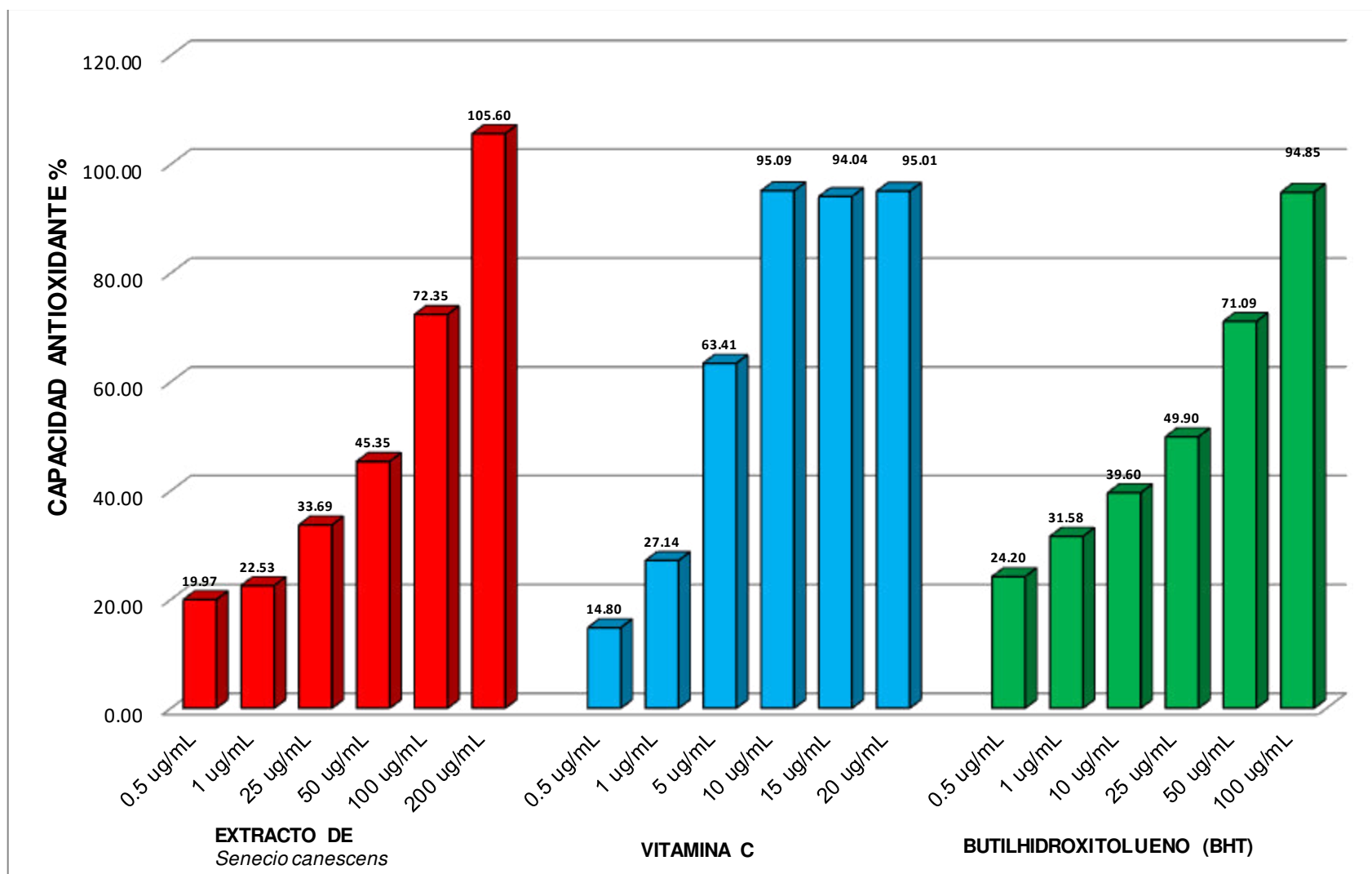


Figura 16. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

Tabla 22. Niveles sanguíneos de Superóxido Dismutasa (U SOD/mL sangre) por la administración del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

| Tratamientos | N | U SOD/mL \pm DS | Intervalo de confianza para la media 95 % | | Error Típico | Sig. |
|------------------------|---|---------------------|---|-----------------|--------------|-------|
| | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Grupo 1 (Basal) | 6 | 183.75 \pm 9.47 * | 165.48 | 202.01 | 7.10 | 0,013 |
| Grupo 2 (Estrés) | 6 | 210.20 \pm 3.69 | 202.05 | 218.35 | 3.17 | - |
| Grupo 3 (EXT100 mg/kg) | 6 | 176.52 \pm 6.32 * | 164.81 | 188.23 | 4.56 | 0,001 |
| Grupo 4 (EXT200 mg/kg) | 6 | 184.11 \pm 5.51 * | 173.45 | 194.76 | 4.14 | 0,014 |
| Grupo 5 (EXT300 mg/kg) | 6 | 190.73 \pm 8.25 | 174.21 | 207.24 | 6.42 | 0,100 |

* Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo 2 (estrés) empleando un ANOVA con post test de Tukey.

* $p < 0,05$

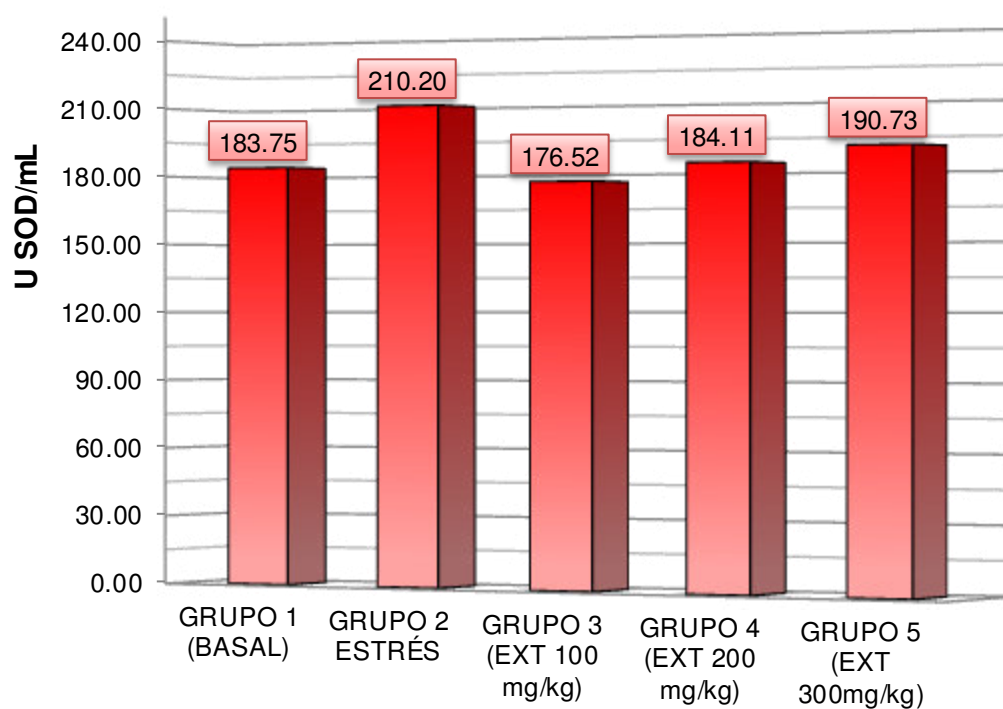


Figura 17. Promedio de niveles sanguíneos de Superóxido Dismutasa (U SOD/mL sangre) por grupo de estudio.

Tabla 23. Niveles sanguíneos de Glutación Peroxidasa (U GPx/mL sangre) por la administración del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira".

| Tratamientos | N | U GPx/mL \pm DS | Intervalo de confianza para la media 95 % | | Error Típico | Sig. |
|-------------------------|---|-----------------------|---|-----------------|--------------|-------|
| | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Grupo 1 (Basal) | 6 | 5979,81 \pm 11,14* | 5280,56 | 6679,06 | 272,02 | 0,001 |
| Grupo 2 (Estrés) | 6 | 8997,19 \pm 15,58 | 7526,51 | 10467,88 | 572,12 | - |
| Grupo 3 (EXT 100 mg/kg) | 6 | 6576,36 \pm 19,60 * | 5223,72 | 7929,00 | 526,20 | 0,008 |
| Grupo 4 (EXT 200 mg/kg) | 6 | 7039,02 \pm 19,19 * | 5621,67 | 8456,38 | 551,38 | 0,043 |
| Grupo 5 (EXT 300 mg/kg) | 6 | 7601,22 \pm 9,14 | 6872,29 | 8330,16 | 283,57 | 0.235 |

* Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo 2 (estrés) empleando un ANOVA con post test de Tukey.

* $p < 0,05$

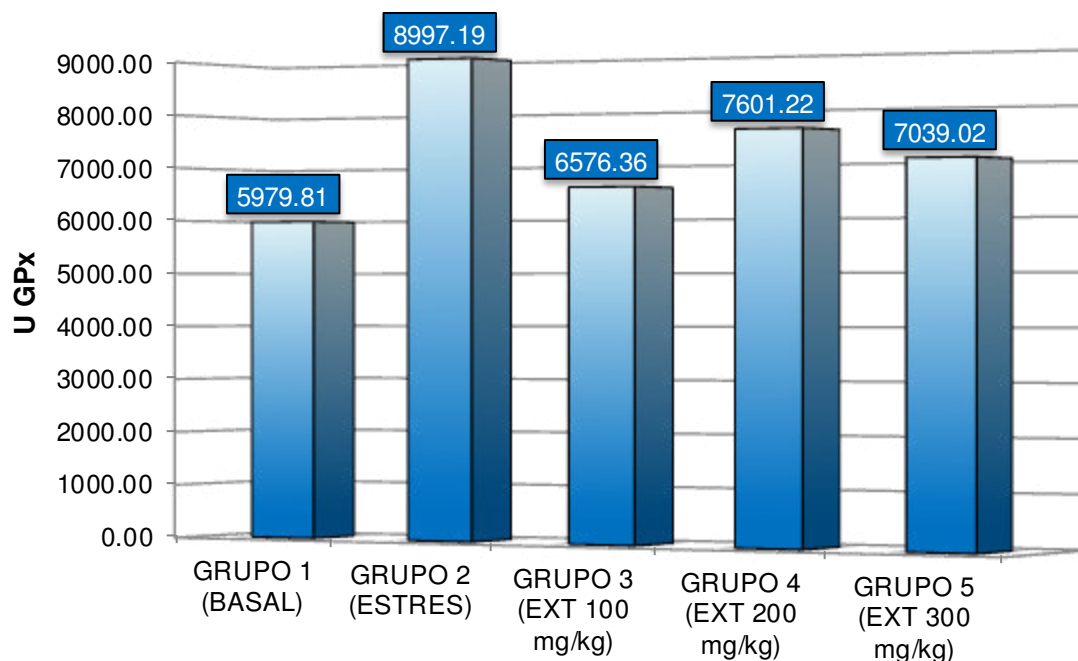


Figura 18. Promedio de niveles sanguíneos de Glutación Peroxidasa (U GPx/mL sangre) por grupo de estudio.

Tabla 24. Niveles sanguíneos de Catalasa (UI CAT/mL sangre) por la administración del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

| Tratamientos | N | UI CAT/mL \pm DS | Intervalo de confianza para la media 95 % | | Error Típico | Sig. |
|------------------------|---|---------------------|---|-----------------|--------------|-------|
| | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Grupo 1 (Basal) | 6 | 828.26 \pm 10.00 | 741.34 | 915.19 | 33.82 | 0,054 |
| Grupo 2 (Estrés) | 6 | 1074.88 \pm 13.99 | 917.08 | 1232.68 | 61.39 | - |
| Grupo 3 (EXT100 mg/kg) | 6 | 976.63 \pm 14.83 | 824.60 | 1128.66 | 59.14 | 0,776 |
| Grupo 4 (EXT200 mg/kg) | 6 | 913.50 \pm 16.12 | 758.94 | 1068.01 | 60.11 | 0,344 |
| Grupo 5 (EXT300 mg/kg) | 6 | 867.18 \pm 21.99 | 667.04 | 1067.31 | 77.86 | 0,137 |

No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos en estudio empleando un ANOVA con post test de Tukey. Sin embargo se pudo notar una tendencia a disminuir la actividad de la catalasa con respecto al grupo 2 (estrés).

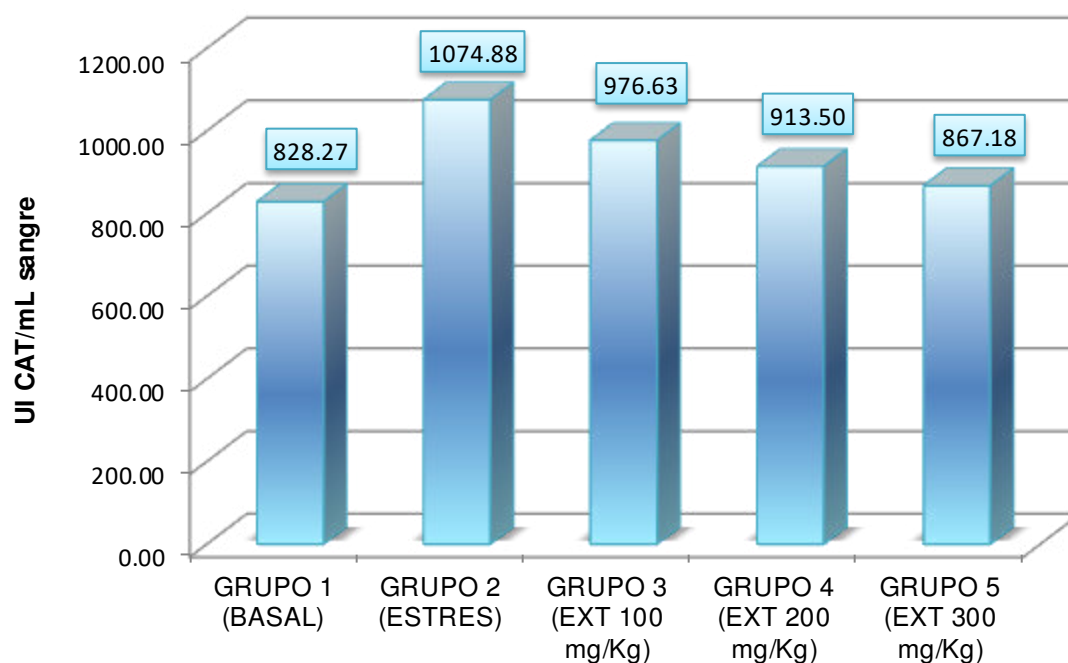


Figura 19. Promedio de niveles sanguíneos de Catalasa (UI CAT/mL sangre) por grupo de estudio.

Tabla 25. Niveles sanguíneos de malondialdehído (µmoles/mL sangre) por la administración del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. "vira-vira".

| Tratamientos | N | µmoles/mL ± DS | Intervalo de confianza para la media 95 % | | Error Típico | Sig. |
|-------------------------|---|-------------------|---|--------------------|-----------------|-------|
| | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| Grupo 1 (Basal) | 6 | 5,04 ± 0,61* | 4,41 | 5,68 | 0,25 | 0,000 |
| Grupo 2 (Estrés) | 6 | 15,64 ± 2,34 | 13,19 | 18,1 | 0,95 | - |
| Grupo 3 (EXT 100 mg/kg) | 6 | 10,76 ± 0,87* | 9,84 | 11,68 | 0,36 | 0,000 |
| Grupo 4 (EXT 200 mg/kg) | 6 | 7,89 ± 0,58* | 7,27 | 8,50 | 0,24 | 0,000 |
| Grupo 5 (EXT 300 mg/kg) | 6 | 5,43 ± 0,53* | 4,88 | 5,99 | 0,22 | 0,000 |

* Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo 2 (estrés) empleando un ANOVA con post test de Tukey.

* p < 0,05

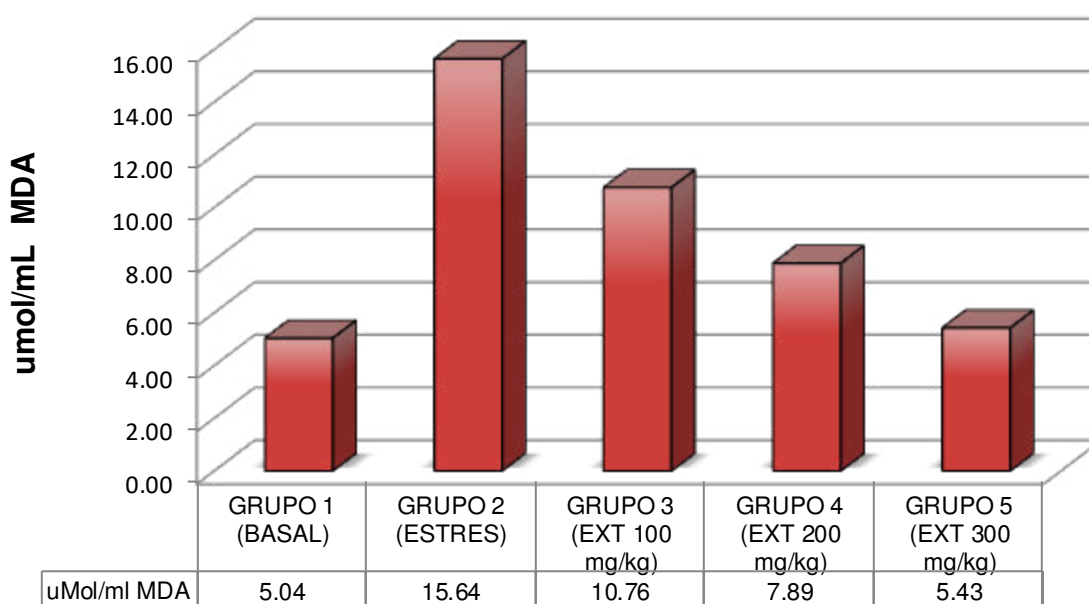


Figura 20. Promedio de niveles sanguíneos de malondialdehído (µmoles/mL sangre) por grupo de estudio.

V. DISCUSIÓN

Se preparó el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” en una proporción de 70:30 alcohol y agua, trabajos anteriores lo citan como los mejores solventes para la extracción y separación de principios activos entre sí, a diferencia de un extracto acuoso que es poco selectivo y poco estable en el tiempo⁸⁴. El extracto hidroalcohólico seco de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” es mayormente soluble en solventes como el agua, etanol, metanol. (Tabla 14), lo cual podría evidenciar un mayor contenido de compuestos polares.

La marcha fitoquímica realizada al extracto seco del *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” evidencia mayor cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos (tabla 15), lo cual concuerda con lo reportado en otras especies del mismo género como *Senecio culcitoides* weed, publicado por Soriano MY et al.⁸⁵, así como los diferentes tipos de flavonoides presentes en especies como *S. argunensis*, *S. cineraria*, *S. viscosissimus*, *S. pseudotites* y *S. mikanioides* reportados por Yang et al.¹³ Flavonoides y compuestos fenólicos tienen propiedades antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas, anti-mutagénicas y antiinflamatorias^{86,87}. De igual manera el ensayo evidenció presencia de saponinas, lo cual es contrastable por lo publicado por Fontan⁸⁸ donde muestra una lista variada de familias con sus respectivos géneros ricos en compuestos saponínicos, dentro de la cual está nuestro género estudiado.

El análisis cromatográfico en capa fina mostró la presencia de dos fracciones fluorescentes frente a la luz UV, estas fracciones fueron analizadas mediante la prueba de Shinoda para corroborar la presencia de flavonoides, dando ambas un resultado positivo. Posteriormente se procedió a su lectura en el espectrofotómetro UV–visible, según la metodología de Mabry et al.⁷⁰, para dar así una aproximación experimental en la caracterización estructural del flavonoide aislado. Ambas fracciones mostraron la presencia de dos bandas de fuerte absorción (Tabla 16), guardando correlación con el tipo de espectro esperado para los flavonoides. La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm, asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm, debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoílo). De acuerdo a la comparación con espectros UV reportados por Mabry et al.⁷⁰ Se proponen las siguientes metabolitos: isoflavona (Fracción 1), flavona o flavonoles (Fracción 2) (Anexo 6). Otros autores también han reportado en sus estudios del género *Senecio*, flavonoides como: quercetín-3-rutinósido, 3-metilquercetina entre otros⁸⁹.

La seguridad del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” se evaluó por el método de clasificación de toxicidad aguda por vía oral (test N° 423) de la OECD. Este método fue desarrollado como una alternativa para reemplazar la prueba DL50 oral. El método ATC es un procedimiento de evaluación secuencial que utiliza sólo tres animales, del mismo sexo por paso, en cualquiera de los niveles de dosis definidas. Este enfoque da como resultado la reducción del número de animales utilizados en comparación

con la prueba DL50 por 40 a 70 %. Se procedió a evaluar la dosis de 2000 mg/kg, la prueba se realizó en 3 ratas hembras, debido a que muestran mayor sensibilidad⁷¹, la dosis evaluada resultó no tóxica a lo largo de todo el periodo de ensayo que fue de 14 días (Tabla 17), ya que no se observó la aparición de ningún síntoma de toxicidad, además no hubo mortalidad a la dosis probada lo que nos permite afirmar que la DL 50 se ubica por encima de 2000 mg/kg, considerándose el extracto como No Clasificado (no tóxico), de acuerdo a las Clases de Toxicidad de la Comunidad Europea (anexo 7). En el 2011 Bussmann R.W et al. evaluaron la toxicidad de *Senecio canescens* reportándola como una especie no tóxica, resultado igual al obtenido en nuestro estudio⁹⁰.

El efecto antiinflamatorio se determinó por la inducción de edema plantar con carragenina en la pata posterior derecha, considerado como un modelo experimental de inflamación aguda. Asimismo, se conoce que la carragenina estimula la producción de prostaglandinas, las cuales promueven los procesos inflamatorios⁹¹. Por otro lado el proceso inflamatorio producido por carragenina inicia con la inducción y liberación de histamina, serotonina y quininas de fase temprana, así como prostaglandinas, proteasas y lisosomas en fases tardías⁹². Los grupos tratados con los estándares (Grupo 2 y Grupo 3) y extractos (Grupo 4, Grupo 5 y Grupo 6), mostraron menor volumen promedio comparados con el grupo control (tabla 18) y a partir de la quinta hora hubo mejor recuperación del proceso inflamatorio inducido ($p < 0.05$), con excepción del grupo 5 que tuvo valor significativo a las 7 horas, tal como se evidencia en la eficacia antiinflamatoria:

26,68 %, 17,32 % y 27,69 % a las 5 horas (tabla 19), respectivamente a la dosis de 100, 250 y 500 mg/kg, observándose de esta manera un efecto similar a la prednisona (28,82 %) e ibuprofeno (33 %). En otro estudio similar se determinó la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de *Tridax procumbens* a las mismas dosis usadas en este trabajo (100, 250 y 500 mg/kg), se obtuvo porcentajes de inhibición de 10,82 %, 16,80 % y 11,39 % respectivamente a las 3 horas⁹², siendo estos resultados menores a los obtenidos en nuestro trabajo de investigación (25,97 %, 15,94 % y 23,02 %). Posiblemente esta diferencia se deba a una mayor presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides (flavona), los cuales se ha comprobado que producen una disminución de la actividad sobre la COX-1 y principalmente la COX-2⁹³. Por otro lado, estos flavonoides naturales además de ser inhibidores de la COX-2 actúan como antioxidantes contra O₂ y especies radicalarias sin consumirse durante el proceso, permitiendo su reutilización en otras interacciones contra el O₂, lo cual sumado al inhibición de la ciclooxigenasa (COX) contribuirían a mejorar su capacidad antiinflamatoria⁹³. Otra posible acción de los flavonoides es mediante la inhibición de MAPK, responsable de la transcripción de las óxido nítrico sintasa (NOS), IL-1B y el TNF- α , evitando respuesta inflamatoria. También puede influir en la activación de los factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NFKB), que responde a la señalización de p38, implicado en la inducción de iNOS, el cual es un factor determinante en la respuesta inflamatoria en el SNC. Todos estos datos sugieren que estos extractos fitoquímicos también poseen efectos antiinflamatorios⁹⁴.

Para el ensayo de analgesia los grupos tratados con el estándar (Tramadol) y extractos (400, 800 y 1200 mg/kg) mostraron mayor efecto analgésico con relación a la medición basal; Tramadol (39,67 %) y extractos (16,65 %, 20,84 % y 28,55 % respectivamente) (tabla 20), con un $p < 0.05$ el cual indica una diferencia significativa en relación al grupo control. De la relación estándar-extractos (figura 15) se puede deducir dosis dependencia de la actividad analgésica. Okuyama E. et al. determinaron la actividad analgésica de un extracto hexánico de *Culcitium canescens* (basónimo de *Senecio canescens*), donde se determinó la presencia de metabolitos secundarios como cacalonol, dehidrocacalohastina y cacalohastina (compuestos sesquiterpenicos)¹⁷, los cuales podrían estar presente en el extracto trabajado; como también podríamos indicar que la acción de los flavonoides o cualquier otro metabolito con acción antiinflamatoria estaría ejerciendo la actividad analgésica, ya que “se sabe que los mecanismos de acción de las actividades antiinflamatoria y analgésica están relacionados a través de la inhibición de la PGE2”⁹⁵.

Se determinó la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”, por el método de la decoloración del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). Los resultados de actividad antioxidante son expresados en porcentaje, observándose una relación directa entre la concentración y la capacidad antioxidante, tal como se muestra en la Tabla 21. La figura 15 representa la capacidad antioxidante obtenida a las diferentes concentraciones para el extracto de vira-vira, vitamina C y BHT. A una

concentración de 100 µg/mL se obtuvo un 72,35 % de captación de radical libre para el extracto de vira-vira; comparados frente al BHT, el cual presentó una capacidad antioxidante de 94,85 %. Se calculó el valor de IC₅₀ para el extracto, vitamina C y para el BHT, que es la concentración necesaria causante del 50 % de la inhibición de la absorbancia (tabla 21). Un valor bajo del IC₅₀ significa una mayor actividad antioxidante. A partir de los resultados mostrados se puede indicar que el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” presenta un valor de IC₅₀ de 62,95 µg/mL en contraste con los patrones de BHT 25,64 µg/mL y vitamina C 4,11 µg/mL, si bien es cierto el IC₅₀ para el extracto es mayor, este podría convertirse en candidato para el aislamiento de sustancias activas como antioxidantes. De acuerdo a los resultados del tamizaje fitoquímico preliminar (Tabla 15), son los flavonoides, triterpenos y esteroides los responsables de la actividad antioxidante. Además estudios anteriores del género *Senecio* encontraron una potente actividad antioxidante con IC₅₀ entre 25,40 y 70,80 µg/mL usando la metodología del DPPH^{10,96}, nuestros resultados nos indican que *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” se encuentra dentro de este rango pudiendo considerarse también como una especie con potencial antioxidante.

La generación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres son un proceso normal durante el metabolismo celular, el cual está compensado por un complejo sistema antioxidante. Sin embargo, la exposición a contaminantes,

medio ambiente, estilo de vida y situaciones patológicas, pueden generar exceso y acumulación de radicales, resultando en el establecimiento de estrés oxidativo⁸.

Un indicador sensible del nivel de estrés oxidativo es el eritrocito, que durante su ciclo vital entra en contacto con las más diversas estructuras orgánicas. Los eritrocitos son susceptibles a lesiones oxidativas en función del alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas y a las altas concentraciones intracelulares de oxígeno y hemoglobina, que son promotores potenciales de procesos oxidativos. A pesar de todo, los eritrocitos contienen muchas enzimas antioxidantes, tales como la SOD, glutatión peroxidasa y catalasa, además de antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas C y E, y el glutatión⁹⁷. Por ello se evaluó el nivel de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx y CAT) y la concentración de malondialdehído (MDA) en eritrocitos.

Nuestros resultados (grafico 16-19) indican que el estrés por inmovilización (grupo 2-estrés) induce un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de las enzimas SOD y GPx, presumiblemente como un mecanismo de defensa, mientras que el incremento de la CAT no fue estadísticamente significativo. Además los niveles de peroxidación lipídica (MDA) aumentaron significativamente en comparación con el grupo control. El incremento de la actividad de la SOD durante el estrés por detenimiento es un indicador de un aumento relativo en la producción de radicales superóxido, lo que podría estimular la segunda línea de defensa incluyendo GPx y CAT⁹⁸. En general estos cambios se deben a que el estrés de inmovilización induce tanto a la tensión psicológica (reacción de escape) como al

estrés físico (trabajo muscular), lo que resulta en una movilidad y agresividad restringida⁶⁰, es decir un estrés psicofisiológico típico, el cual induce a la formación de EROs y conduce a la peroxidación⁵⁹. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Oishi et al. y Ahmad et al.^{12,16} quienes reportaron un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes y marcadores de peroxidación lipídica.

El tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” impidió el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes inducido por el estrés oxidativo, ya que la actividad de la SOD disminuye con los tratamientos de 100 mg/kg (176,52 USOD/mL de sangre) y 200 mg/kg (184,11 USOD/mL de sangre) siendo esta disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$), no observándose este comportamiento para el extracto de 300 mg/kg (190,73 USOD/mL de sangre) respecto al grupo estrés por detenimiento (210,20 USOD/mL de sangre), (Figura 17 y Tabla 22). La SOD es la enzima cuya actividad debe incrementarse en caso de un mayor consumo de oxígeno, como el caso del estrés inducido.

Nuestros resultados de la enzima GPx muestran una marcada disminución con el extracto a dosis de 100 mg/kg (6576,36 UGPx/mL) y 200 mg/kg (7039,02 UGPx/mL) en comparación con los valores hallados en el grupo control positivo (8997,19 UGPx/mL) (figura 18) (tabla 23). Este hecho estaría justificado debido a que la GPx es más eficiente frente al estrés oxidativo que la catalasa y mucho más

que la superóxido dismutasa⁹⁹, razón por la cual la GPx constituye un importante mecanismo de defensa.

Con respecto a la actividad CAT no se observó una disminución significativa en los grupos a los cuales se les administró el extracto, respecto al grupo al cual solo se le sometió a estrés grupo 2 (figura 19)(tabla 24). La catalasa es la enzima que reduce el producto de la SOD, es decir, el peróxido de hidrógeno hasta agua y se espera que una menor actividad de SOD deba ir acompañada de una menor actividad de catalasa. Además la CAT mantendría sus valores normales al mantenerse activos los otros sistemas antioxidantes¹⁰⁰. En general las enzimas antioxidantes SOD y Catalasa están íntimamente ligadas, la SOD por su alta constante específica de velocidad hace que se acumulen altas concentraciones de H₂O₂, como se ha discutido ampliamente en otro trabajo¹⁰¹. Al acumularse esta sustancia se activa la enzima catalasa, por ser insuficiente la acción que la otra enzima encargada de la eliminación de peróxidos (glutación peroxidasa) puede ejercer para mantener los niveles adecuados de esta especie reactiva.

El tratamiento previo con el extracto impidió las perturbaciones inducidas (estrés) en las actividades de las enzimas antioxidantes, ésto nos sugiere que el extracto contiene metabolitos secundarios que coadyuvan o protegen a las enzimas antioxidantes, como por ejemplo los flavonoides^{102,103}. Éstos actúan limpiando los radicales activos para suprimir la iniciación de la cadena y/o rompen las reacciones de propagación de la cadena.

Evidencia de la peroxidación de lípidos inducida por el estrés oxidativo se puede ver con la aparición de las TBARS de productos metabólicos. En nuestro estudio, se sugiere que el estrés por inmovilización, el estrés psicofisiológico típico, induce la formación de EROs que son capaces de dañar diversos componentes de nuestro organismo. Sin embargo, mientras que el método de reacción de ácido tiobarbitúrico es muy popular y ampliamente utilizado, su especificidad es muy baja. El método mide cantidad malondialdehído, compuesto de tres carbonos, que no deriva exclusivamente de ácidos grasos poliinsaturados sino que también de la degradación inducida por las EROs de aminoácidos, carbohidratos y ácidos nucleicos⁶⁰. En el figura 20 y tabla 25 se muestran los resultados de MDA en sangre tanto en el control como en los tratamientos, se nota una disminución significativa en los valores de MDA en los grupos a los cuales se le administró el tratamiento en comparación con el grupo estrés (grupo 2). Esto tiene concordancia con los resultados obtenidos por diversos autores^{14,16,104-106}.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” presenta alcaloides, triterpenos, saponinas y flavonoides de los cuales se proponen los siguientes metabolitos: isoflavonas y flavonas o flavonoles.
- Por vía oral posee mayor eficacia antiinflamatoria a la dosis de 500 mg/kg (37,52 %) en comparación con los patrones de ibuprofeno 120 mg/kg (41,16 %) y prednisona 1,2 mg/kg (48,04 %).
- Presenta mayor efecto analgésico a una dosis de 1 200 mg/kg (28,55 % EMP) en comparación con la solución de referencia Tramadol (39,67 % EMP).
- Inhibe el 50 % de la reacción en el ensayo de DPPH a una dosis de 62,95 µg/mL en comparación con la vitamina C y BHT (4,11 µg/mL y 25,64 µg/mL, respectivamente), y de igual manera presenta actividad antioxidante determinada con la actividad de las enzimas SOD (176,52 y 184,11 U/mL) y GPx (6576,36 y 7039,02 U/mL) reduciendo los niveles de peroxidación lipídica de MDA (10,76; 7,89 y 5,43 µmol/mL sangre), todas en comparación con su respectivo grupo control.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios fitoquímicos más detallados en el aislamiento y elucidación de cada uno de los metabolitos más abundantes (flavonoides, alcaloides, triterpenos y saponinas) hallados en el presente estudio.
- Realizar más ensayos para evaluar la actividad biológica de cada uno de los metabolitos aislados y compararlo con la eficacia que muestra el extracto total.
- Realizar estudios de investigación haciendo uso del extracto para determinar la eficacia antiinflamatoria, analgésica y antioxidante; aplicándolo en alguna forma farmacéutica tópica.
- Incentivar la conservación y uso racional de esta especie, ya que es un recurso natural promisorio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Puelles M, Gómez V, Galán J. Las plantas medicinales de Perú. Madrid: Los libros de la Catarata; 2010. 9-10 pp.
2. Simões C, Schenkel E, Gosmann G, Mello J, Mentz L.A. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5ª ed. Porto Alegre, Brasil: Editora da UFRGS; 2004. 424 p.
3. Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner A. Polyphenols from cocoa and vascular health - a critical review. Int. J. Mol. Sci. 2009;10: 4290–4309.
4. Palacios E. Economía y plantas medicinales. Boletín CSI. 2004; 52: 28-31.
5. Bonilla P. Flavonoides de *Ephedra Americana* (pinco-pinco), acción biológica sobre el sistema inmunológico (IgE). Tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM. 2001.
6. Casado R, Landa A, Calvo J, Garcia J, Marston A, Hostettmann K, Calvo M. Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. Biol. Pharm. 2011;49(6):620-6.
7. Carughi A., Gronert K. Inflamación: Los ácidos grasos omega-3 y su relación salud/enfermedad. [internet][citado: 7 de abril del 2017]. Disponible en: http://www.gnldcontent.com/omega3/sp/pdf/SABinflammatoryArticleFinal_v7_sp.pdf
8. Sánchez V, Méndez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Rev Invest Med Sur Mex. 2013;20(3):161–8.

9. Hariprasath L, Jegadeesh R, Arjun P, Raaman N. *In vitro* propagation of *Senecio candicans* DC and comparative antioxidant properties of aqueous extracts of the *in vivo* plant and *in vitro*-derived callus. South African J Bot. 2015;98:134–141.
10. Albayrak S, Aksoy A, Yurtseven L, Yaşar A. A Comparative Study on Antioxidant and Antimicrobial Activities of four *Senecio* L. Species from Turkey. 2015;2(2):26–36.
11. Alvarado B, Reyes A, Castillo J, Maldonado M. Evaluación del efecto antiinflamatorio de *Senecio confusus*. Ciencias Nat y Exactas. 2014;2:163–170.
12. Ahmad A, Rasheed N, Chand K, Maurya R, Banu N, Palit G. Restraint stress-induced central monoaminergic & oxidative changes in rats & their prevention by novel *Ocimum sanctum* compounds. The Indian Journal of Medical Research. 2012;135(4):548-554.
13. Yang Y, Zhao L, Wang Y, Chang M, Huo C, Gu Y et al. Chemical and Pharmacological Research on Plants from the Genus *Senecio*. Chemistry Biodivers. 2011;8:13-72.
14. Şahin E, Gümüşlü S. Immobilization stress in rat tissues : Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. Comp Biochem Physiol. 2007;144:342–7.
15. Soriano MY, Bonilla P, Arroyo J, Pereyra S. Actividad cicatrizante tópica de los metabolitos secundarios en el extracto etanólico de hojas de *Senecio culcitooides* Weed. Folia Dermatológica Perú. 2004;15(3):155–9.

16. Oishi K, Yokoi M, Maekawa S, Sodeyama C, Shiraishi T. Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. *Acta Physiol Scand.* 1999;165:65–69.
17. Okuyama E, Umeyama K, Ohmori S, Yamazaki M, Satake M. Pharmacologically active components from a Peruvian medicinal plant, Huira-Huira (*Culcitium canescens* H. & B.) *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1994;42(10):2183–6.
18. Pelser P, Nordenstam B, Kadereit J, Watson L. An ITS phylogeny of tribe Senecioneae (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. *Taxon.* 2007; 56(4): 1077-1104.
19. Beltran H. Roque J. El género *Senecio* L. (Asteraceae-Senecioneae) en el departamento de Lima, Perú. *Arnaldoa.* 2015; 22 (2):395–412.
20. Bremer K. *Asteraceae: cladistics and classification.* Timber Press. Portland, Oregon. 1994.
21. Nordenstam B, Pelser P. Watson L. *Lomanthus*, a new genus of the Compositae-Senecioneae from Ecuador, Peru, Bolivia and Argentina. *Compositae Newsletter.* 2009;47:33-40.
22. Vision T. Dillon M. Sinopsis de *Senecio* L. (Senecioneae, Asteraceae) para el Perú. *Arnaldoa.* 1996; 4(1): 23–46.
23. Beltrán H, Granda A, León B, Sagástegui A, Sánchez I, Zapata M. Asteraceae endémicas del Perú. *Rev. peru. biol.* 2006;13(2): 64s-164s.
24. Loja B. Contribución al Estudio Florístico de la Provincia de la Concepción (Junín): Dicotiledóneas. Tesis para optar el grado académico de magister en

Botánica tropical. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 2002.

25. Van den Brink M. The mountain flora of North Peru, *Senecio canescens* [Internet]. 2009 [cited 3 April 2017]. Available from: <http://photos.v-d-brink.eu/Flora-and-Fauna/South-America/Peru-Northern-part/i-DnCFg3g/A>.
26. De la Cruz H, Vilcapoma G, Zeballos P. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 111:284-294.
27. Hammond G, Fernandez I, Villegas L, Vaisberg A. A survey of traditional medicinal plants from the Callejon de Huaylas, Department of Ancash, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998; 61:17-30.
28. Monigatti M, Bussmann R, Weckerle C. Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolivar Province, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 145:450-464.
29. Rehecho S, Uriarte-Pueyo I, Calvo J, Vivas L, Calvo M. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 133:75-85.
30. Bussmann R, Malca G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 132:101-108.
31. Bussmann R, Douglas S, Perez F, Diaz D. Antibacterial activity of Northern-Peruvian Medicinal plants. *Arnaldoa* 2008; 15(1):127 – 148.

32. Blanco F, Cañete J, Pablos J. Técnicas de investigación básica en reumatología [libro electrónico]. España: Ed. Médica Panamericana; 2007 [Consultado: 4 de Febrero del 2017]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=zDM5hxzRpqkC&pg=PA91&dq=inflamacion+y+reumatologia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwit_PkhqrTAhUIRSYKHUoKBNkQ6wEIIITAA#v=onepage&q=inflamacion%20y%20reumatologia&f=false
33. Castellanos R. Respuestas inmunes innata y adaptativa. Medisan. 2000;4(2):64-74.
34. Bórdes R. El proceso inflamatorio. Rev Enfermería. 1994;4(4):9-12.
35. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional [libro electrónico]. España: Ed. GEA Consultoría Editorial; 2010 [Consultado el 3 de febrero del 2017]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=43SdNbLLQ3AC&printsec=frontcover&dq=patologia+estructural+y+funcional&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjhkZaZ-6nTAhWBbSYKHxh0CtAQ6wEIIzAA#v=onepage&q&f=false>
36. Ashley N, Weil Z, Nelson R. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. Annu Rev Ecol Evol Syst. 2012; 43(1):385-406.
37. Ahmed U. An overview of inflammation: Mechanism and consequences. Front Biol China. 2011;6(4):274-81.
38. García A, López J, Sánchez M. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. Medicina intensiva. 2000; 24(8); 353-360.
39. García P. Inflamación. Revista Real Academia de ciencias exactas. 2008;102(1); 91-159.

40. Regal M, Borges A, Armas J, Alvarado M, Cedeño V, Cuesta J. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. Rev Finlay. 2015;5(1):47-62.
41. Grisolle A. Tratado elemental y práctico de patología interna de las inflamaciones en general. Universidad Complutense. Ed. D. Ignacio Biox. 1846;1:239-266.
42. Fallis A. Inflammation. Journal of Chemical Information and Modeling. 2013;53(9):1689-99.
43. Cirión G, Herrera M. Anatomía Patológica. Temas para enfermería [Internet]. 6ta ed. Cimed: Ciencias Médicas. [citado 7 febrero 2017]. Disponible en: <https://clea.edu.mx/biblioteca/Cirion%20Herrera%20-%20Anatomia%20Patologica%20-%20Temas%20Para%20Enfermeria.pdf>
44. Rodriguez J, Menendez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. 2001;30(1):36–44.
45. Aruoma O. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. 1998;75(2):199–212.
46. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods : Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4(8):118–26.
47. Ahumada O., Bardales M. Perfil enzimático antioxidante en habitantes de Nueva Cajamarca–San Martín [Tesis de grado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2011.
48. Pham-huy L, He H, Pham-huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. 2008;4(2):89–96.

49. Wu D, Cederbaum A. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Res Heal*. 2003;27(4):277–284.
50. Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007;19:1807–19.
51. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol*. 2006;141(6):312–22.
52. Willcox J, Ash S, Catignani G. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44:275-95
53. Zelko I, Mariani T, Folz R. Superoxide Dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(3):337–49.
54. Chelikani P, Fita I, Loewen P. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:192–208.
55. Brigelius R. Tissue-specific functions of individual Glutathione Peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(99):951–65.
56. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;28(3):1–21.
57. Reuter S, Gupta S, Chaturvedi M, Aggarwal B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(11):1603–16.
58. Duračková Z. Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol Res*. 2010;59:459–469.

59. Bagchi D, Carryl O, Tran M, Bagchi M, Garg A, Milnes M, et al. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Mol Cell Biochem.* 1999;196(1–2):109–116.
60. Singh L, Pang X, Alexacos N, Letourneau R, Theoharides T. Acute Immobilization Stress Triggers Skin Mast Cell Degranulation via Corticotropin Releasing Hormone, Neurotensin, and Substance P: A Link to Neurogenic Skin Disorders. *Brain Behav Immun.* 1999;13:225–39.
61. Ibañez S, Morales C, Calleja M, Moreno P, Galvez R. Terapéutica: tratamiento del dolor. *Form Contin para Farm Hosp.* 2010;122-51.
62. Flórez J. Fármacos y dolor [Internet]. Madrid: Ergon. C/ Arboleda; Publicado: 2004. [Consultado el 7 febrero de 2017]. Disponible en: <http://clinicalevidence.pbworks.com/f/Farmacosydolor.pdf>
63. Farmacoterapia para el control del dolor: pautas de uso. Reunión de expertos. Salamanca; 29 y 30 de Septiembre del 2008. Universidad de Salamanca; p. 53-54. Disponible en: http://www.catedradeldolor.com/PDFs/Docencia_Expertos/2008%20Farmacoterapia.pdf
64. Hall V, Murillo N., Rocha M., Rodriguez E. Antiinflamatorios no esteroidales (AINE'S) [Internet]. Cuba: Centro de Información de medicamentos. Publicado: 2001. [Consultado: 07 febrero del 2017]. Disponible en: <http://sibdi.ucr.ac.cr/boletinespdf/cimed18.pdf>

65. Clemente M, Santos J, Sánchez-Montero FJ. Farmacología de los analgésicos no opiáceos. 2005. 50 p.
66. Arroyo J, Raez E, Rodríguez M, Chumpitaz V, Burga J, De la Cruz W, et al. Actividad antihipertensiva y antioxidante del extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado (*Zea mays* L.) en ratas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2008;25(2):195-99.
67. Instituto Nacional de Salud (Perú). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2008.
68. Lock de Ugaz. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. Segunda Edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994
69. Raaman N. Phytochemical techniques. Qualitative Phytochemical screening. Primera edición. Editado por: New India Publishing Agency. 2006. 1: 19-22.
70. Mabry T, Markhan K, Thomas M. The systematic identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. 1970. pp: 16- 147.
71. OECD. Organization for economic co-operation and development. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class. Test N° 423. pp: 1-14. 2001.
72. Winter CA, Porter CA. Effect of alteration in side chain upon antiinflammatory and liver glycogens activities of hydrocortisone esters. *J Am Pharm Sc*. 1957; 46:515-519.

73. Sughisita E, Amagaya S, Ogihara Y. Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. J Pharmacol Biodyn. 1981; 4: 565-575.
74. Ouchi K, Sekine J, Koga Y, Nakao S, Sugiyama K. Establishment of an animal model of epidural anesthesia and sedative tail-flick test for evaluating local anesthetic effects in rats. Exp Anim. 2013;62(2):137-44.
75. Bannon A, Malmberg A. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. Curr Protoc Neurosci. 2007; 8:8-9.
76. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm.Wiss. Technol. 1995;22(1), 25-30.
77. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol. 2004;26(2):211–219.
78. Inoue T, Koyama T, Muraki A, Yamashita I. Effects of single and repeated immobilization stress on corticotropin-releasing factor concentrations in discrete rat brain regions. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry. 1993;17:161-70.
79. Mac Cord. Superoxide Dismutase – an Enzyme Function for Erythrocyte. J.B.C. 1969; 244 (22): 6049-6053
80. Plagia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J.Lab.Clin. Med. 1967; 70:158-168.
81. Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.

82. Hong Yu, Yeh Shu, Chang Chia, Hu Miao. Total plasma Malondialdehyde levels in 16 Taiwanese College Students determined by various Thiobarbituric acid chromatography-based method. *Clinical Biochemistry*. 2000; 33(8): 619-625.
83. Yahyavi H, Kaykhaili M, Hashemi M. A rapid spectrofluorimetric method for the determination of malondialdehyde in human plasma after its derivatization with thiobarbituric acid and vortex assisted liquid-liquid microextraction. *RSC Adv*. 2016;6(3):2361–7.
84. Joshi N, Dhyani S, Nain J. Phytochemical screening of secondary metabolites of *Argemone mexicana* Linn. Flowers. *Int J Curr Pharm Res*. 2013;5(2):4.
85. Soriano MY, Bonilla P, Arroyo J, Pereyra S. Aspectos fitoquímicos y actividad cicatrizante de *Senecio culcitoides* Weed. *Cienc Invest*. 2004;7(2):49-53.
86. Arts I. and Hollman P. Polyphenols are disease risk in epidemiological studies. *Amer. J.Clin. Nutr*. 2005;81: 317-325.
87. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Cri. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 2005.45: 287-306
88. Fontan J. Las saponinas y la botánica. Madrid. *Anales*.1958;15(1); 501-521.
89. Ragaa M, Nabil A. Flavonoids of three local *Senecio* species. *Photochemistry*. 1981; 20(5):1180-1181.
90. Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;137:121–140.

91. Vitalone H, Mercau G, Davolio S, Mercau G, Valdez J, Gómez S, et al. Acción de la carragenina e indometacina en el desarrollo y población de células cebadas en un fibrosarcoma murino. *Rev Española Patol.* 2005;38(2):87-92.
92. Meshram R, Patil M. Demonstration of anti-inflammatory activity of alcoholic and hydroalcoholic extracts of *Tridax procumbens* using the rat paw edema assay. *Biosci Biotech Res Comm.* 2011;4(1):47-51.
93. Moreno N, Zampini I, Isla M, Al E. Actividad antiinflamatoria de flavonoides naturales estructuralmente relacionados. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromáticas.* 2007;6(6):313-4.
94. Álvarez G, Bustos I, Castaeda C, Guevara J, Romero I. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *ResearGate.* 2010;24:143-54.
95. Toro V. Evaluación de la actividad analgésica aguda y crónica de *Phytolacca dioica* [Tesis de grado]. Chile: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2009.
96. Albayrak S, Aksoy A, Hamzaoglu E, Ekici L, Budak U. Antimicrobial and antioxidant activities of *Senecio* species growing in the Black Sea region , Turkey. *Acta Botanica Gallica.* 2008; 155(3): 447-456
97. Vazquez M, El-Bacha R, Ordas C, Ribeiro E, Vicente J, Rodrigues L. Dieta afro-bahiana, estrés oxidativo y ejercicio físico. *Rev Nutr, Campinas.* 2006;19(6):673–83.
98. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97–112.

99. Cisneros E. La glutathion reductasa y su importancia biomédica. *Rev Cubana Invest Biomed.* 1995;14(1).
100. Tang L, Zhang Y, Qian Z, Shen X. The mechanism of Fe²⁺ initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. *Biochem J.* 2000;352:27–36.
101. Hartnett E, Stratton R, Browne R, Rosner B, Lanham R. Serum Markers of Oxidative Stress and Severity of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care.* 2000;23(2):234–40.
102. Ramírez E. Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “Huamanpinta”. Tesis de Doctor en Farmacia y Bioquímica. UNMSM. 2014.
103. Martinez S, Gonzales J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;17(6):271–8.
104. Fontella F, Siqueira I, Vasconcellos A, Tabajara A, Netto C, Dalmaz C. Repeated Restraint Stress Induces Oxidative Damage in Rat Hippocampus. *Neurochemical Research.* 2005;30(1):105–11.
105. Vuolo F, Lucca G, Comim C, Valvassori S, Re G, Dal-pizzol F, et al. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International.* 2009;54:358–62.
106. Zaidi K, Al-qirim T, Banu N. Effects of Antioxidant Vitamins on Glutathione Depletion and Lipid Peroxidation Induced by Restraint Stress in the Rat Liver. *Drugs R D.* 2005;6(3):157–65.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Clasificación taxonómica de la especie



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N°014-USM-2017

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (tallo, hojas, raíz) recibida de **Ronald Griego CERVANTES MACIZO y Héctor Marlon CHILQUILLO TORRES**, estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor De San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Senecio canescens*** (H.B.K.) Cuatrecasas y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: *Senecio*


ESPECIE: *Senecio canescens* (H.B.K) Cuatrecasas

Nombre vulgar: "vira vira"

Determinado por Mg. Maria I. La Torre A.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 31 de enero de 2017


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ANEXO 2. Certificados de calidad de los animales de experimentación



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Bioterio - Vicerrectorado de Investigación

CERTIFICADO

San Martín de Porres, 13 de diciembre de 2016

Mediante la Presente se certifica que los 40 ratones, (20 hembras y 20 machos), de la cepa albina Balb, cuyos pesos se encuentran entre 25g a 30 g, adquiridos el 13 de diciembre de 2016 por el **Sr. Héctor Chiquillo Torres**, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizada en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente;


Dr. CHRISTIAN PITOT ALVAREZ
Jefe de Bioterio
LID - UPCH
C.M.V. 8985

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31. Apartado postal 4314, Lima 100
Teléfono: (511) 319-0000 anexo: 2710
E-mail: Christian.pitot@upch.pe



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Bioterio - Vicerrectorado de Investigación

CERTIFICADO

San Martín de Porres, 13 de diciembre de 2016

Mediante la Presente se certifica que las 72 ratas albinas (*Rattus norvegicus*), de la cepa Holtzman, hembras, de peso aproximado de 200g, adquiridos el 13 de diciembre de 2016, por el **Sr. Héctor Chiquillo Torres**, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizada en cualquier protocolo Biomédico.

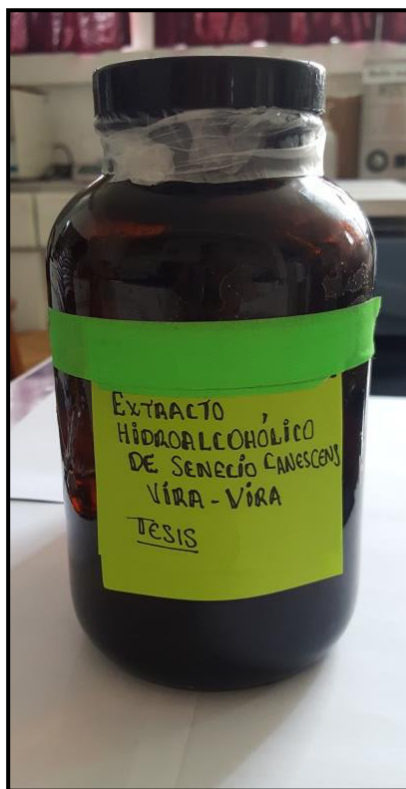
Atentamente;



Dr. CHRISTIAN PITOT ALVAREZ
Jefe de Boterio
LID - UPCH
C.M.V. 8985

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31. Apartado postal 4314, Lima 100
Teléfono: (511) 319-0000 anexo: 2710
E-mail: Christian.pitot@upch.pe

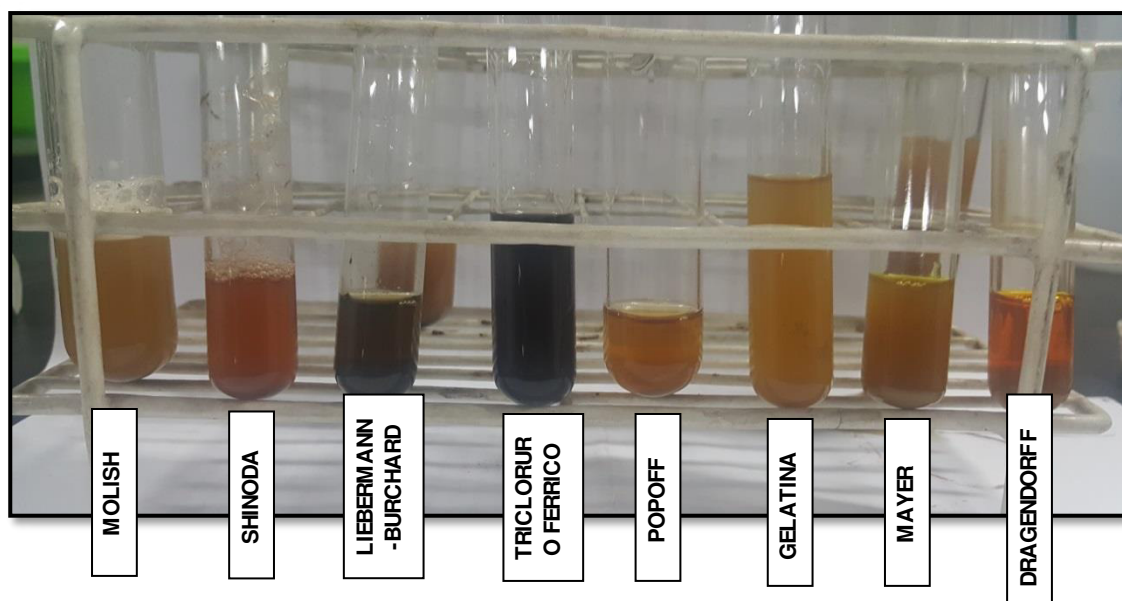
ANEXO 3. Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.



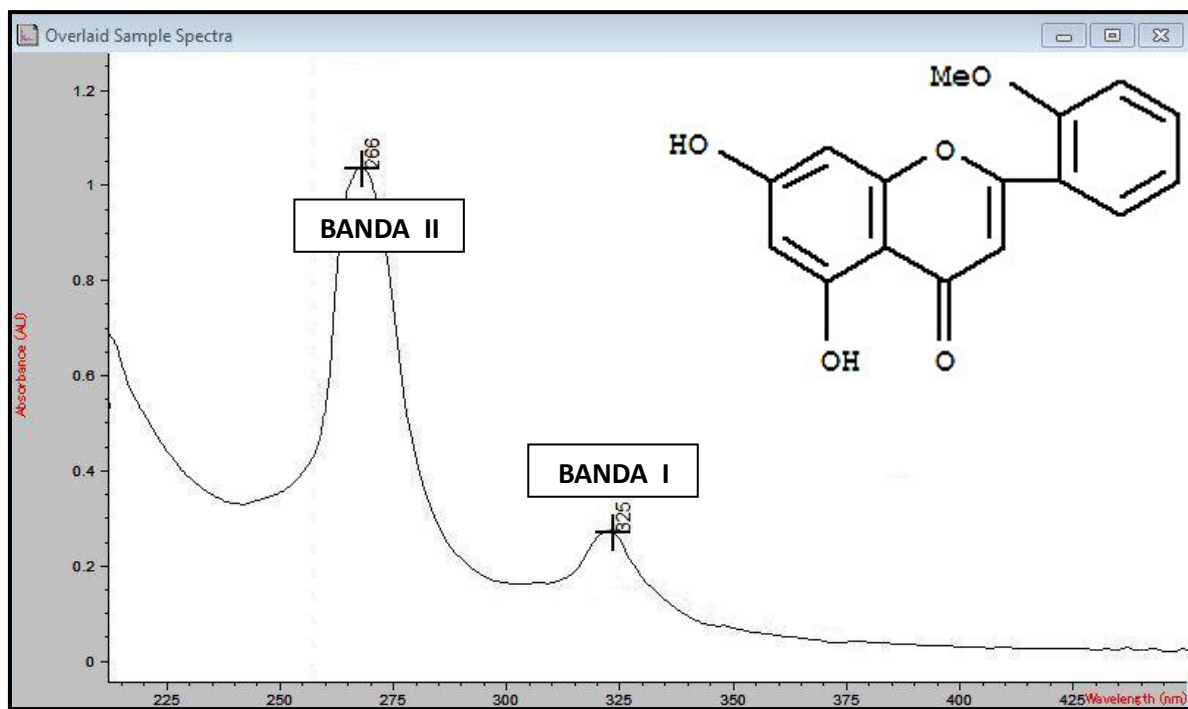
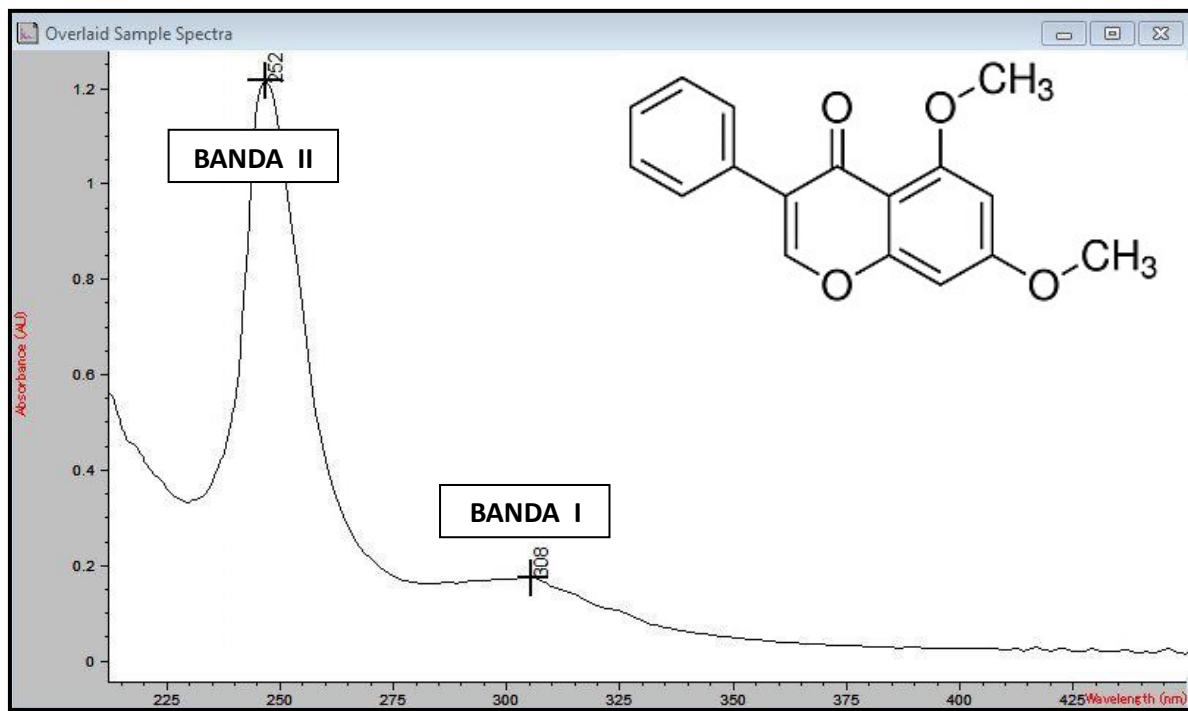
ANEXO 4. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.



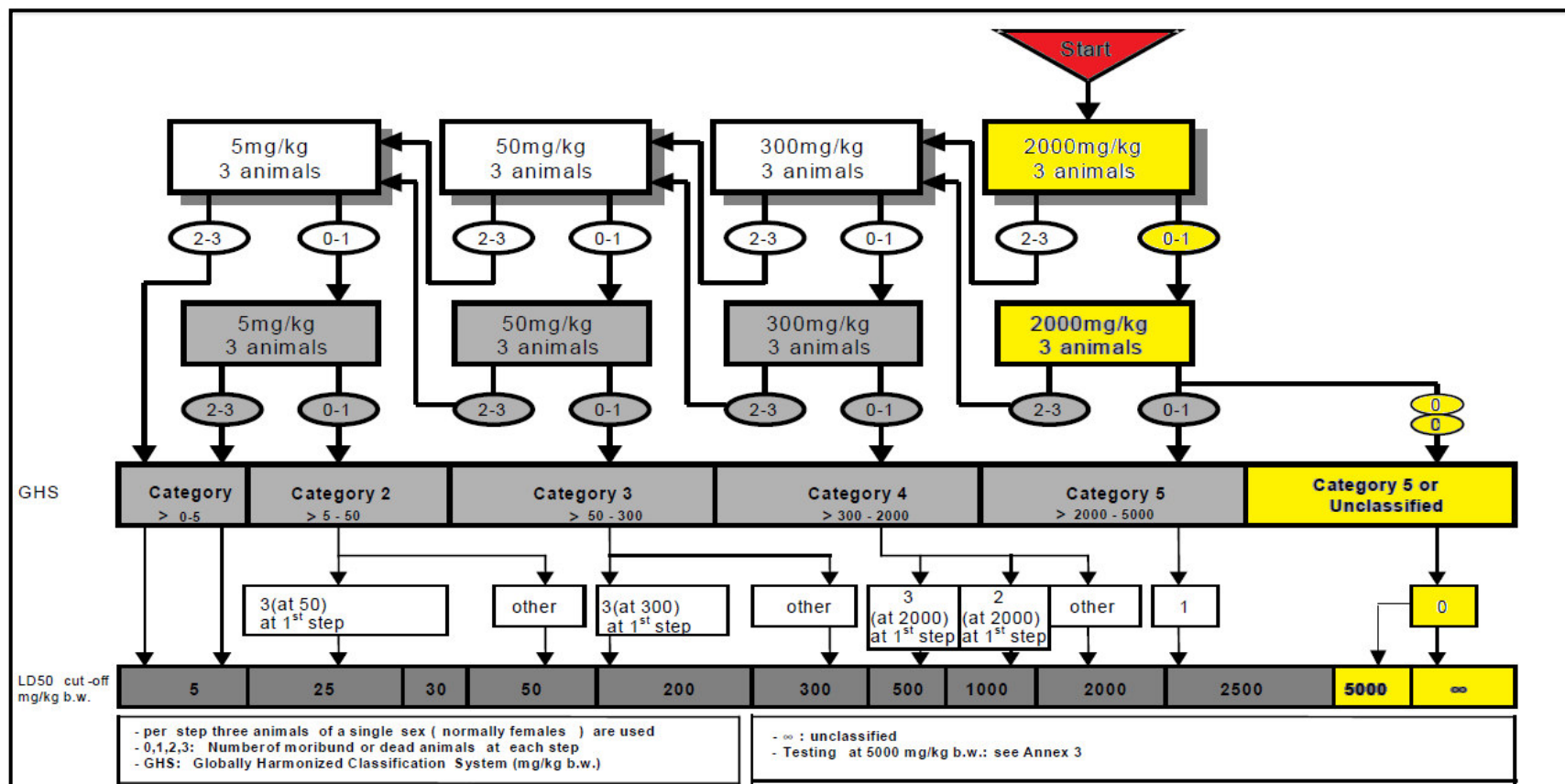
ANEXO 5. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.



ANEXO 6. a) Barrido espectral y posible metabolitos de flavonoides.



ANEXO 7. Determinación de la toxicidad a dosis fija de 2000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.

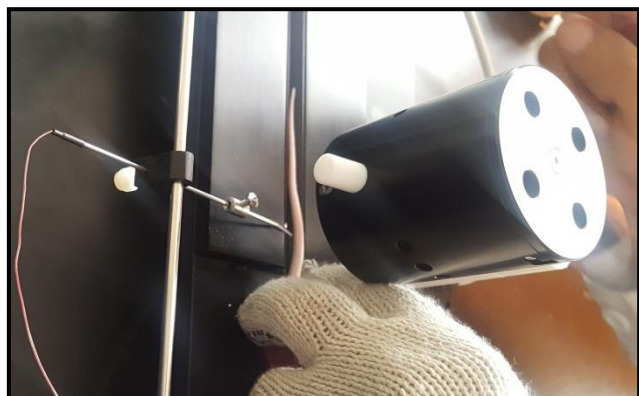


El nivel de dosis inicial debe ser el que más probablemente produzca mortalidad en algunos de los animales dosificados. Cuando la información disponible sugiere que la mortalidad es improbable se inicia con la dosis más alta (2000 mg/kg de peso corporal). La categoría 5 se refiere a las sustancias de toxicidad aguda relativamente baja según Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (GHS)⁶⁹.

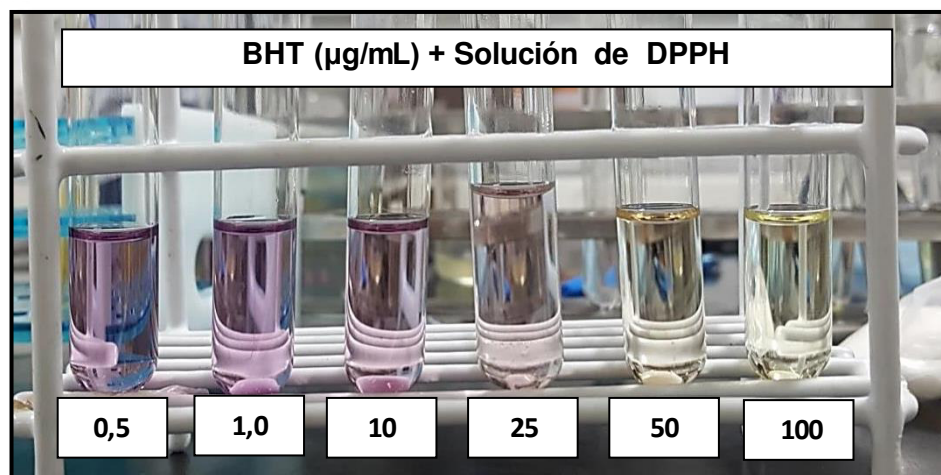
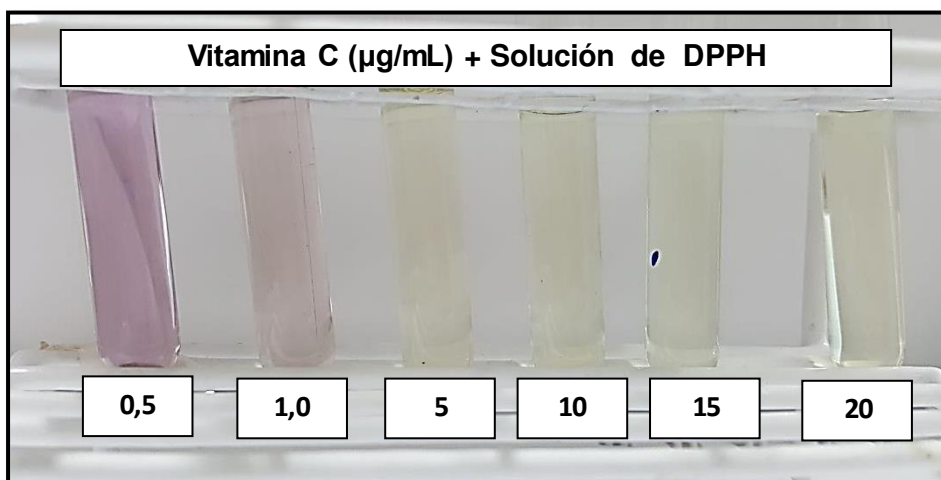
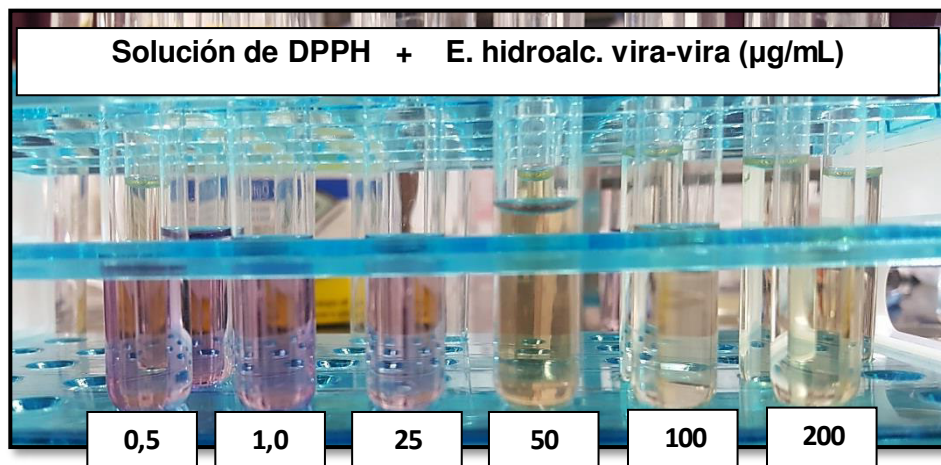
ANEXO 8. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.



ANEXO 9. Evaluación del efecto analgésico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.



ANEXO 10. Evaluación de la actividad antioxidante (DPPH) del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”.



ANEXO 11. Cepos para estrés por detenimiento.



ANEXO 12. Punción cardiaca



ANEXO 13. Análisis estadístico ensayo efecto antiinflamatorio

| TRATAMIENTOS | Significancia p | | | | |
|-------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| TIEMPO (horas) | 1 | 2 | 3 | 5 | 7 |
| GRUPO 2 (PREDNISONA) | 0,396 | 0,326 | 0,101 | 0,004 | 0,000 |
| GRUPO 3 (IBUPROFENO) | 0,124 | 0,405 | 0,225 | 0,001 | 0,000 |
| GRUPO 4 (EXT 100 mg/kg) | 0,631 | 0,173 | 0,062 | 0,008 | 0,000 |
| GRUPO 5 (EXT 250 mg/kg) | 0,996 | 0,528 | 0,477 | 0,172 | 0,001 |
| GRUPO 6 (EXT 500 mg/kg) | 0,437 | 0,491 | 0,126 | 0,006 | 0,000 |

Tablas Estadísticas

Comparaciones Múltiples

EFFECTO ANTIINFLAMATORIO

Variable dependiente: 1 hora

HSD Tukey

| (I) TRATAMIENTO (J) TRATAMIENTO | | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confían.95% | |
|---------------------------------|--------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. superior |
| CONTROL | IBUPROFENO | .2267 | .11656 | .396 | -.1279 | .5812 |
| | PREDNISONA | .3050 | .11656 | .124 | -.0495 | .6595 |
| | EXTRACTO 100 mg/Kg | .1817 | .11656 | .631 | -.1729 | .5362 |
| | EXTRACTO 200 mg/Kg | .0567 | .11656 | .996 | -.2979 | .4112 |
| | EXTRACTO 300 mg/Kg | .2183 | .11656 | .437 | -.1362 | .5729 |

Se basa en las medias observadas.

Variable dependiente: 2 horas

HSD Tukey

| (I) TRATAMIENTO (J) TRATAMIENTO | | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confían.95% | |
|---------------------------------|--------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|------------|
| | | | | | L. inferior | L.superior |
| CONTROL | IBUPROFENO | .2350 | .11314 | .326 | -.1091 | .5791 |
| | PREDNISONA | .2183 | .11314 | .405 | -.1258 | .5625 |
| | EXTRACTO 100 mg/Kg | .2767 | .11314 | .173 | -.0675 | .6208 |
| | EXTRACTO 200 mg/Kg | .1950 | .11314 | .528 | -.1491 | .5391 |
| | EXTRACTO 300 mg/Kg | .2017 | .11314 | .491 | -.1425 | .5458 |

Se basa en las medias observadas.

Variable dependiente: 3 horas

HSD Tukey

| (I) TRATAMIENTO | (J) TRATAMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confían.95% | |
|-----------------|--------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. inferior |
| CONTROL | IBUPROFENO | .3383 | .12453 | .101 | -.0404 | .7171 |
| | PREDNISONA | .2867 | .12453 | .225 | -.0921 | .6654 |
| | EXTRACTO 100 mg/Kg | .3667 | .12453 | .062 | -.0121 | .7454 |
| | EXTRACTO 200 mg/Kg | .2250 | .12453 | .477 | -.1538 | .6038 |
| | EXTRACTO 300 mg/Kg | .3250 | .12453 | .126 | -.0538 | .7038 |

Se basa en las medias observadas.

Variable dependiente: 5 horas

HSD Tukey

| (I) TRATAMIENTO | (J) TRATAMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confían.95% | |
|-----------------|--------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. inferior |
| CONTROL | IBUPROFENO | .3800* | .09318 | .004 | .0966 | .6634 |
| | PREDNISONA | .4350* | .09318 | .001 | .1516 | .7184 |
| | EXTRACTO 100 mg/Kg | .3517* | .09318 | .008 | .0683 | .6351 |
| | EXTRACTO 200 mg/Kg | .2283 | .09318 | .172 | -.0551 | .5117 |
| | EXTRACTO 300 mg/Kg | .3650* | .09318 | .006 | .0816 | .6484 |

Se basa en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

Variable dependiente: 7 horas

HSD Tukey

| (I) TRATAMIENTO | (J) TRATAMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confían.95% | |
|-----------------|--------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. inferior |
| CONTROL | IBUPROFENO | .5933* | .08476 | .000 | .3355 | .8511 |
| | PREDNISONA | .5083* | .08476 | .000 | .2505 | .7661 |
| | EXTRACTO 100 mg/Kg | .4317* | .08476 | .000 | .1739 | .6895 |
| | EXTRACTO 200 mg/Kg | .3783* | .08476 | .001 | .1205 | .6361 |
| | EXTRACTO 300 mg/Kg | .4633* | .08476 | .000 | .2055 | .7211 |

Se basa en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

EFECTO ANALGÉSICO

Variable dependiente: EMP

HSD Tukey

| (I) GRUPO | (J) GRUPO | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confian.95% | |
|-----------|---------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. superior |
| BLANCO | | | | | | |
| | TRAMADOL 10mg/Kg | -36.6038 [*] | .97246 | .000 | -39.3996 | -33.8079 |
| | EXTRACTO 400 mg/Kg | -13.5863 [*] | .97246 | .000 | -16.3821 | -10.7904 |
| | EXTRACTO 800 mg/Kg | -17.7763 [*] | .97246 | .000 | -20.5721 | -14.9804 |
| | EXTRACTO 1200 mg/Kg | -25.4825 [*] | .97246 | .000 | -28.2784 | -22.6866 |

Se basa en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VIVO*

Variable dependiente: U SOD

HSD Tukey

| (I) TRATAMIENTO | (J) TRATAMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confian.95% | |
|-----------------|-----------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. superior |
| ESTRES | BLANCO | 26.4533 [*] | 7.47561 | .013 | 4.4984 | 48.4082 |
| | EXT100 mg/Kg | 33.6801 [*] | 7.47561 | .001 | 11.7252 | 55.6350 |
| | EXT200 mg/Kg | 26.0926 [*] | 7.47561 | .014 | 4.1377 | 48.0475 |
| | EXT300 mg/Kg | 19.4739 | 7.47561 | .100 | -2.4810 | 41.4287 |

Se basa en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

Variable dependiente: U GPx

HSD Tukey

| (I) GRUPOS (J) GRUPOS | | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confían.95% | |
|-----------------------|--------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. inferior |
| ESTRES | BLANCO | 3017.3844 [*] | 651.95944 | .001 | 1102.6634 | 4932.1054 |
| | EXTRACTO 100 mg/Kg | 2420.8334 [*] | 651.95944 | .008 | 506.1124 | 4335.5544 |
| | EXTRACTO 200 mg/Kg | 1958.1734 [*] | 651.95944 | .043 | 43.4524 | 3872.8944 |
| | EXTRACTO 300 mg/Kg | 1395.9714 | 651.95944 | .235 | -518.7496 | 3310.6924 |

Se basa en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

Variable dependiente: UI CAT

HSD Tukey

| (I) GRUPOS (J) GRUPOS | | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confían.95% | |
|-----------------------|--------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. inferior |
| ESTRES | BLANCO | 246.6133 | 85.05141 | .054 | -3.1717 | 496.3984 |
| | EXTRACTO 100 mg/Kg | 98.2533 | 85.05141 | .776 | -151.5317 | 348.0384 |
| | EXTRACTO 200 mg/Kg | 161.3833 | 85.05141 | .344 | -88.4017 | 411.1684 |
| | EXTRACTO 300 mg/Kg | 207.7050 | 85.05141 | .137 | -42.0801 | 457.4901 |

Se basa en las medias observadas.

Variable dependiente: μmolMDA

HSD Tukey

| (I) GRUPOS (J) GRUPOS | | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | Interv. Confían.95% | |
|-----------------------|--------------------|----------------------------|----------------|------|---------------------|-------------|
| | | | | | L. inferior | L. inferior |
| ESTRES | BLANCO | 10.6000 [*] | .69338 | .000 | 8.5636 | 12.6364 |
| | EXTRACTO 100 mg/Kg | 4.8833 [*] | .69338 | .000 | 2.8470 | 6.9197 |
| | EXTRACTO 200 mg/Kg | 7.7583 [*] | .69338 | .000 | 5.7220 | 9.7947 |
| | EXTRACTO 300 mg/Kg | 10.2100 [*] | .69338 | .000 | 8.1736 | 12.2464 |

Se basa en las medias observadas.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

